

**CARACTÉRISATION DE L'ADAPTATION CELLULAIRE EN BIOFILM CHEZ
LES GRAM POSITIFS**

par

Martin Gélinas

Mémoire présenté au Département de biologie en vue
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, octobre 2020

Le 06 octobre 2020

*Le jury a accepté le mémoire de Monsieur Martin Gélinas
dans sa version finale.*

Membres du jury

Professeure Pascale B. Beauregard
Directrice de recherche
Département de biologie

Professeur Louis-Charles Fortier
Évaluateur interne
Département de microbiologie et d'infectiologie

Professeur Sébastien Rodrigue
Président-rapporteur
Département de biologie

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier ma directrice de recherche, Pr Pascale B. Beauregard, pour l'opportunité de travailler sur un projet passionnant, ainsi que pour sa supervision et son support tout au long de mon parcours académique. Je remercie également mes conseillers Pr Sébastien Rodrigue et Pr Louis-Charles Fortier pour leurs judicieux conseils et leurs suggestions lors de nos rencontres.

J'aimerais remercier ensuite tous les membres du laboratoire, passés et actuels, pour leur contribution à développer un milieu de travail extraordinaire, par leurs discussions scientifiques pertinentes, leur bonne humeur quotidienne, leur solidarité et leur implication dans la vie sociale du laboratoire. Je n'ai qu'un seul regret : ne jamais avoir remporté la coupe PBB ! Un merci spécial à Arielle Milot et Maude Pomerleau, les deux stagiaires que j'ai eu la chance de superviser durant ma maîtrise.

Je remercie les membres du laboratoire Malouin pour m'avoir fourni les souches sauvages utilisées dans cette étude et de judicieux conseils dans la manipulation de *S. aureus*. Je remercie les membres du laboratoire Rodrigue, particulièrement Dominick Matteau, pour son aide dans les étapes du RNAseq et pour la bio-informatique, ainsi qu'Antoine Champie, pour son aide dans les étapes de la préparation des librairies pour le séquençage et pour la qPCR. Enfin, je remercie Pr Jean-Philippe Côté, pour son généreux don de plusieurs souches de *S. aureus* USA300 de la *Nebraska Transposon Mutant Library*.

Enfin, je remercie l'Université de Sherbrooke et le CRSNG, qui fut l'organisme subventionnaire de mon projet de recherche.

SOMMAIRE

Un biofilm est une communauté multicellulaire bactérienne conglomérée dans une matrice de substances polymériques extracellulaires et adhérente à une surface. Les biofilms confèrent une résistance de 10 à 1000 fois la concentration minimale inhibitrice d'une bactérie planctonique aux antibiotiques, dû à plusieurs facteurs de résistance intrinsèques propre au biofilm face aux conditions hostiles de son environnement. Cette résistance entraîne souvent l'échec des traitements prodigués lors de l'infection d'un implant biomédical, qui peut alors se transformer en infection chronique persistante difficile à éradiquer. Plusieurs études ont rapporté que la formation du biofilm chez certaines bactéries à Gram positifs est caractérisée par un remodelage ou une altération de différentes voies métaboliques, telles que le métabolisme central du carbone, des acides gras, des nucléotides ou encore la production de métabolites secondaires. La régulation de la formation du biofilm serait donc un processus complexe et certaines adaptations cellulaires pourraient jouer un rôle crucial dans la formation du biofilm chez les bactéries à Gram positif *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis*, les pathogènes les plus retrouvés dans le cas d'infections d'implants biomédicaux. À l'aide d'une étude du transcriptome, dont le design nous permet d'évaluer l'influence de l'environnement, nous avons identifié plusieurs voies métaboliques régulées positivement ou négativement lors de la formation du biofilm chez ces deux espèces bactériennes. Selon mes résultats, trois voies métaboliques sont communément régulées chez les cellules en biofilm : la biosynthèse de métabolites secondaires, la biosynthèse d'antibiotiques et la biosynthèse des purines. Aucune voie cellulaire sous-exprimée lors de la formation du biofilm n'a été identifiée comme commune aux bactéries examinées. La biosynthèse *de novo* de l'IMP, une voie cellulaire précurseure importante pour la biosynthèse des purines, semble être l'adaptation cellulaire la plus prometteuse à cibler pour diminuer la formation du biofilm chez *S. aureus* et *E. faecalis*. Une mutation des

gènes *purL* codant pour l'enzyme phosphoribosylformylglycinamide synthase, et *purH*, codant pour la phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase et l'IMP cyclohydrolase (ATIC), diminue du tiers la production du biofilm comparée à la souche sauvage. Cette voie pourrait donc devenir une cible thérapeutique intéressante pour développer des combinaisons thérapeutiques ciblant un plus large spectre de bactéries, améliorant l'efficacité des antibiotiques actuels et évitant le développement de résistance aux traitements.

Mots-clés : *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, biofilm, transcriptomique, purines, biosynthèse *de novo* de l'IMP

TABLE DES MATIÈRES

CHAPITRE 1 INTRODUCTION	1
1.1. Les biofilms.....	1
1.1.1. Les étapes de formation du biofilm.....	2
1.1.2. Les biofilms et les infections chroniques persistantes	3
1.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	6
1.2.1. Le biofilm de <i>S. aureus</i>	7
1.2.1.1. Attachement et microcolonie.....	7
1.2.1.2. Maturation et dispersion	8
1.3. <i>Enterococcus faecalis</i>	12
1.3.1. Historique de la caractérisation du biofilm de <i>E. faecalis</i>	13
1.3.2. Le biofilm d' <i>E. faecalis</i>	14
1.3.2.1. Attachement et microcolonie.....	14
1.3.2.2. Maturation et dispersion	15
1.4. Les nouvelles stratégies anti-biofilm	16
1.4.1. Inhiber l'attachement	17
1.4.2. Cibler les cellules persistantes	18
1.4.3. Couper la communication bactérienne	19
1.4.4. Dégrader les constituants de la matrice	19
1.4.5. Utiliser des combinaisons thérapeutiques	20
1.5. Hypothèse de recherche et objectifs.....	20
1.5.1. L'adaptation cellulaire en biofilm	21
1.5.2. La transcriptomique du biofilm des bactéries de l'étude.....	23

1.5.3.	La voie de biosynthèse des purines	24
1.5.3.1.	Voie de biosynthèse <i>de novo</i> de l'IMP	26
1.5.3.2.	Voie de biosynthèse des purines	27
1.5.3.3.	Voie de sauvetage des purines.....	28
1.5.4.	Les souches de références de l'étude.....	30
CHAPITRE 2 ARTICLE SCIENTIFIQUE.....		32
2.1.	Introduction de la publication	32
2.1.1.	Résumé de l'article.....	32
2.1.2.	Originalité du travail.....	33
2.1.3.	Contribution des auteurs	34
2.1.4.	Référence de l'article.....	34
2.2.	Manuscrit soumis de l'article scientifique	34
2.2.1.	Abstract.....	35
2.2.2.	Importance	36
2.2.3.	Introduction	36
2.2.4.	Results	39
2.2.4.1.	Determination of the growth condition for biofilm harvest.	39
2.2.4.2.	Transcriptomic analysis reveals global changes in gene expression during biofilm formation.....	42
2.2.4.3.	Media effect on gene expression.	44
2.2.4.4.	Gene set enrichment analysis (GSEA) reveals global cellular adaptations during biofilm formation.	45
2.2.4.5.	Common cellular adaptations between <i>S. aureus</i> and <i>E. faecalis</i> strains during biofilm formation.	47

2.2.4.6. Purine biosynthesis remodelling during biofilm formation.	49
2.2.4.7. Genes involved in the <i>de novo</i> IMP biosynthesis pathway are important for biofilm production.	51
2.2.5. Materials and Methods	54
2.2.5.1. Strains and media	54
2.2.5.2. Growth measurement (planktonic cells and biofilm)	55
2.2.5.3. mRNA extraction and isolation.....	55
2.2.5.4. Construction of prokaryotic Illumina libraries	56
2.2.5.5. RNA sequencing data analysis	57
2.2.5.6. Functional annotation.	58
2.2.5.7. Core genome circular comparison	59
2.2.5.8. Statistical analysis	59
2.2.6. Discussion	59
2.2.7. Conflicts of interest.....	62
2.2.8. References	63
2.2.9. Acknowledgments	74
2.2.10. Supplementary material	75
CHAPITRE 3 DISCUSSION ET CONCLUSION	87
3.1. Identification des adaptations cellulaires lors de la formation du biofilm chez <i>S. aureus</i> et <i>E. faecalis</i>	87
3.2. Impact du milieu de culture sur le patron d'expression des gènes lors de la formation du biofilm.	87
3.3. Importance de la voie de biosynthèse <i>de novo</i> de l'IMP lors de la formation du biofilm chez les bactéries à Gram positif.	88

3.4. Perspectives et conclusion.	89
BIBLIOGRAPHIE	92

LISTE DES TABLEAUX

Table S1.	Strains used in this study.	75
Table S2.	Prokaryotic Illumina libraries primers.	76
Table S3.	Abbreviation used in the purine biosynthesis pathway.	78
Table S4.	Differential expression analysis and functional annotation of <i>S. aureus</i> and <i>E. faecalis</i> strain during biofilm formation.	79
Table S5.	DEGs from the media influence transcriptomic analysis.	79
Table S6.	Core genome analysis of <i>S. aureus</i> and <i>E. faecalis</i> strains with PATRIC Proteome analysis services.	79

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

Figure 1.1	Abondance des procaryotes dans les différents habitats sur Terre et colonisation de l'humain par les biofilms.	2
Figure 1.2	Représentation schématique de l'ALT.	4
Figure 1.3	Différents facteurs impliqués dans les étapes de formation du biofilm de <i>S. aureus</i>	7
Figure 1.4	Représentation graphique des phénotypes typiques de biofilm de MSSA et de MRSA.	9
Figure 1.5	Mécanismes impliqués dans la formation du biofilm de <i>S. aureus</i>	11
Figure 1.6	Formation de biofilm polymicrobien avec <i>E. faecalis</i>	13
Figure 1.7	Facteurs impliqués dans la formation du biofilm chez <i>E. faecalis</i>	16
Figure 1.8	Représentation schématique des différentes stratégies anti-biofilm existantes.	17
Figure 1.9	Voies métaboliques subissant un remodelage lors de la formation du biofilm de <i>B. subtilis</i>	21
Figure 1.10	Implication du PRPP dans la voie de biosynthèse des purines.	26
Figure 1.11	Voies métaboliques de biosynthèse des purines.	29

CHAPITRE 2 ARTICLE SCIENTIFIQUE

Figure 2.1	Growth dynamic of <i>S. aureus</i> and <i>E. faecalis</i> strains in a planktonic state or during biofilm formation.	41
Figure 2.2	Transcriptional profiles of biofilm-grown cells and planktonic cells.	43
Figure 2.3	Average relative expression of GO:BP terms during biofilm formation.	46
Figure 2.4	Common cellular adaptation between <i>S. aureus</i> and <i>E. faecalis</i> strains.	48
Figure 2.5	The <i>de novo</i> IMP biosynthesis pathway is strongly upregulated during biofilm formation.	50
Figure 2.6	Gene disruption effect on biofilm production.	53
Figure S1	Core genome analysis between Gram-positive strains in a protein sequence-based homology manner.	80
Figure S2	Principal component analysis (PCA) of the variance between the biological replicates from the transcriptomic analysis.	82
Figure S3	Relative expression of KEGG terms during biofilm formation. .	83
Figure S4	Common cellular adaptation between <i>S. aureus</i> and <i>E. faecalis</i> strains according to ShinyGO's database.	85

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES SIGLES

ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADNc :	ADN complémentaire
AIP :	Peptide auto-inducteur
ARN :	Acide ribonucléique
ARNm :	ARN messenger
ATL :	Traitement du verrou antibiotique (Antibiotic lock therapy)
BHI(g/s) :	Brain hearth infusion (+ 0.5% glucose et/ou + 3% NaCl)
CMI :	Concentration minimale inhibitrice
DEG(s) :	Gène(s) différentiellement exprimé(s) (<i>Differentially expressed gene(s)</i>)
erm :	Erythromycine
ESKAPE :	Acronyme des genres <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et <i>Enterobacter</i> spp.
GO:BP :	<i>Gene Ontology : Biological Process</i>
GSEA :	Analyse d'enrichissement d'un groupe de gène (<i>Gene set enrichment analysis</i>)
LTA :	Acide lipotéichoïque
KEGG :	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
M :	Molaire
MDR :	<i>Multi drug resistant</i>

mL :	Millilitre
mM :	Millimolaire
NaCl :	Chlorure de sodium
NTML :	<i>Nebraska Transposon Mutant Library</i>
nm :	Nanomètre
OMS :	Organisation mondiale de la santé
pb :	Paire de base
PBS :	Tampon phosphate salin (<i>Phosphate-buffered saline</i>)
PCR :	<i>Polymerase chain reaction</i>
PIA :	Adhésine intercellulaire polysaccharidique (<i>Polysaccharide intercellular adhesin</i>)
qPCR :	PCR quantitative
QS :	<i>Quorum sensing</i>
SARM :	<i>Staphylococcus aureus</i> résistante à la méticilline
SASM :	<i>Staphylococcus aureus</i> sensible à la méticilline
SD :	Déviation standard (<i>standard deviation</i>)
SEM :	Erreur standard de la moyenne (<i>standard error of the mean</i>)
TSB(g/s) :	Tryptic soy broth (+ 0.5% glucose et/ou + 3% NaCl)
ERV :	<i>Enterococcus</i> résistante à la vancomycine
WT :	Souche sauvage (<i>Wild type</i>)

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1. Les biofilms

Un biofilm est défini comme étant une communauté multicellulaire bactérienne adhérente à une surface ou à une interface, et enchâssée dans une matrice de substances polymériques extracellulaires. Cette matrice est généralement composée d'exopolysaccharides, d'ADN extracellulaire et de protéines. Des substances inorganiques ou abiotiques peuvent également être incorporées dans celle-ci. Un biofilm est un lieu d'organisation, de spécialisation et d'interactions de haute complexité entre les populations qui le composent. Il s'agit d'un système hétérogène et dynamique dont les compositions spatiale et biochimique fluctuent avec le temps. Ces caractéristiques permettent aux bactéries en biofilm de mieux s'adapter à leur environnement et de résister aux conditions austères et hostiles qui se présentent (Flemming and Wuertz, 2019; Flemming et al., 2016).

Les biofilms sont omniprésents dans notre environnement et peuvent être retrouvés dans une grande variété d'habitats environnementaux, comme illustré dans la figure 1.1. Dans ces habitats, excepté les océans, il est estimé que le biofilm représente environ 80% du mode de vie des bactéries. Les biofilms colonisent également le corps humain et sont retrouvés entre autres dans le colon, sur notre peau et formant la plaque dentaire (Flemming and Wuertz, 2019).

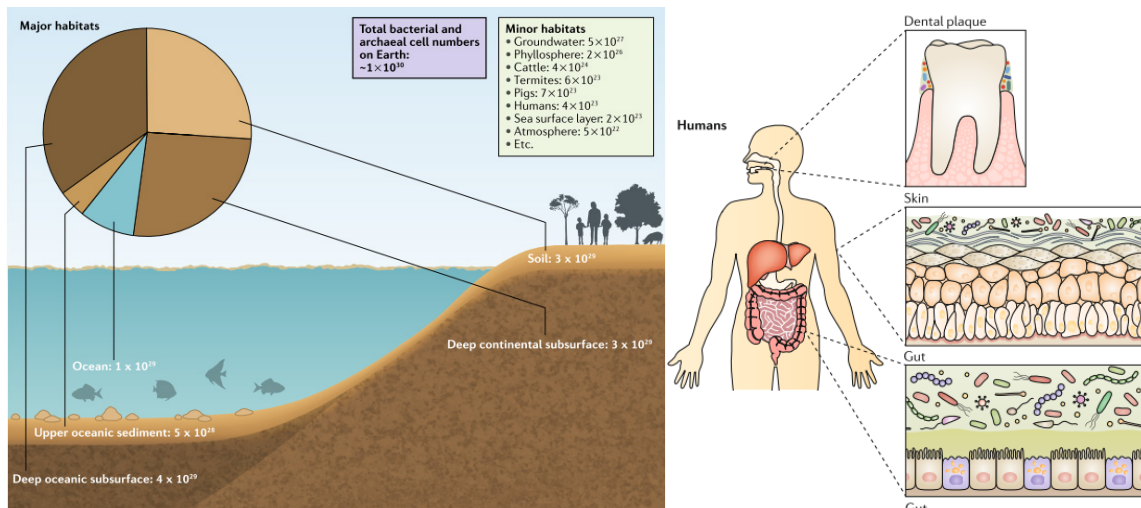


Figure 1.1 Abondance des procaryotes dans les différents habitats sur Terre et colonisation de l'humain par les biofilms (adaptée de Flemming et Wuertz, 2019).

1.1.1. Les étapes de formation du biofilm

Le cycle de développement d'un biofilm se compose de 4 étapes. Des bactéries initient un contact avec une surface biotique ou abiotique, puis interagissent avec celle-ci et s'y attachent à l'aide d'appendices exprimés, tels que des flagelles, des pili et/ou des adhésines (Garrett et al., 2008). Puis, une fois bien attachées, les bactéries se divisent et forment des microcolonies. Elles sont actives métaboliquement et les substrats sécrétés modifieront le microenvironnement local, favorisant l'établissement d'autres communautés microbiennes (Donlan, 2002). Les cellules bactériennes, maintenant en assez grand nombre, communiquent entre elles via certaines molécules spécifiques du *quorum sensing* (QS), ce qui induit l'expression des gènes de formation de la matrice (Solano et al., 2014). Enfin, après la maturation du biofilm, les bactéries commencent à sécréter des facteurs saccharolytiques pour se détacher de la matrice et se disperser (Kaplan, 2010).

1.1.2. Les biofilms et les infections chroniques persistantes

Les biofilms sont reconnus pour causer des problèmes significatifs dans différents milieux d'activité humaine, tels que le secteur de l'agroalimentaire (Galié et al., 2018), le secteur industriel (Sahoo et al., 2015) et le secteur clinique (Høiby et al., 2011). Dans ce dernier milieu, les patients possédant des implants biomédicaux, tels que des prothèses ou des cathéters, sont particulièrement à risque de développer des complications sévères durant ou après leur opération. Un très faible inoculum initial, environ 10 000 fois plus faible que la quantité nécessaire à un pathogène pour coloniser un tissu, suffirait à contaminer un implant (Khatoon et al., 2018). Selon le *National Institutes of Health* (NIH), ce serait jusqu'à 65% des infections microbiennes nosocomiales et 80% des infections chroniques qui seraient causées par la formation de biofilm (Jamal et al., 2018). Une infection chronique se définit comme une infection qui présente des symptômes pendant au moins 3 semaines et qui requiert différents traitements pour être guérie. Les infections chroniques peuvent être asymptomatiques dans les premières semaines, lors de la période d'incubation, et ne se manifester qu'après trois mois suite à la chirurgie de pose d'implant (Arciola et al., 2018). Ces complications entraînent des enjeux et des coûts majeurs pour les hôpitaux et la société : elles augmentent le taux de morbidité et de mortalité des patients (Lewis, 2001), ainsi que la durée et les frais d'hospitalisation (Van Epps and Younger, 2016).

Les infections d'implants biomédicaux peuvent être particulièrement difficiles à traiter, car elles sont souvent insensibles à l'*antibiotic lock therapy* (ALT). Cette thérapie peut être prescrite en prophylaxie aux patients devant avoir un cathéter pendant une longue durée ou en réponse à une infection. Elle consiste à administrer un cocktail d'antibiotiques de forte concentration, soit 10 à 1000 fois plus grande que la concentration minimale inhibitrice (CMI) requise pour tuer une cellule bactérienne planctonique, couplé avec un coagulant et/ou des additifs pour

faciliter l'instillation (Justo and Bookstaver, 2014), tel qu'illustré par la figure 1.2. Cependant, plusieurs problèmes peuvent survenir durant l'ALT. L'utilisation d'une concentration trop grande d'antibiotique augmente le risque de dispersion dans le système vasculaire pouvant potentiellement exposer le patient à une concentration inutilement grande d'antibiotiques ou de coagulant (Justo and Bookstaver, 2014). Il existe également le risque de disperser la charge bactérienne dans le corps du patient, ce qui peut surcharger le système immunitaire, entraîner la dissémination de l'infection ou même causer une septicémie létale (Fleming and Rumbaugh, 2018). En contrepartie, l'utilisation d'une concentration trop faible d'antibiotiques pourrait augmenter la prévalence de bactéries multirésistantes aux drogues (MDR) (Ventola, 2015), déjà très présentes dans les hôpitaux (Wang et al., 2019) .

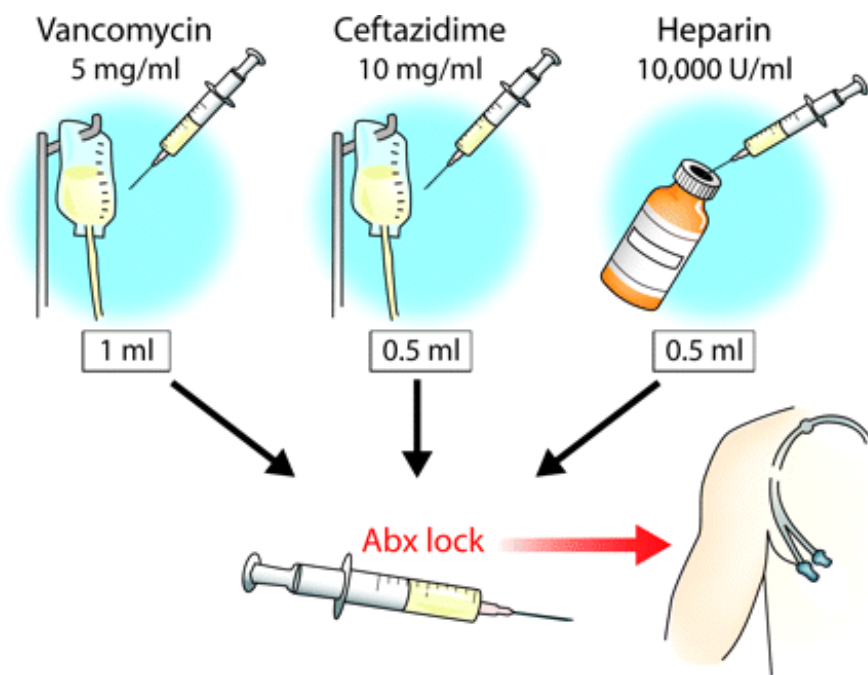


Figure 1.2 Représentation schématique de l'ALT (tirée de Allon, 2007).

Parmi les bactéries les plus susceptibles d'infecter les implants biomédicaux, on retrouve majoritairement des bactéries à Gram positif, anaérobies facultatives,

productrices de biofilms et MDR. Le pathogène le plus couramment isolé de ce type d'infection est *Staphylococcus aureus*, dans environ 36% des cas, suivi d'*Enterococcus* spp. dans environ 19% des cas (Arciola et al., 2018; Public Health Agency of Canada, 2014). Ces deux microorganismes font partie du groupe des ESKAPE, un acronyme des genres *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter* spp. Il s'agit d'un groupe de pathogènes nosocomiaux qui démontrent un haut niveau de virulence et de résistances multiples aux drogues (Mulani et al., 2019). Les ESKAPE sont d'ailleurs sur la liste de priorité critique ou de haute priorité de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) pour la nécessité de développer de nouveaux traitements antibiotiques contre ces bactéries (Tacconelli et al., 2018). Bien que leur prévalence dans les infections d'implants biomédicaux soit plus rare, plusieurs autres ESKAPE y ont déjà été retrouvés (Arciola et al., 2018).

La formation de biofilm confère une résistance bactérienne de 10 à 1000 fois plus grande aux antibiotiques (Davies, 2003), ce qui équivaut aux concentrations utilisées lors de l'ALT, permettant aux bactéries de survivre aux traitements et de causer une infection récurrente. Plusieurs facteurs, énumérés ci-dessous, peuvent expliquer le mode de résistance des biofilms (Khatoon et al., 2018; Lebeaux et al., 2014; Lewis, 2001). Premièrement, la matrice extracellulaire est reconnue pour restreindre la pénétration, la diffusion et l'attachement de molécules antibactériennes. Une diffusion ralentie d'antibiotiques dans le biofilm diminue la concentration qui se rend jusqu'aux cellules, en plus d'augmenter le ratio et donc l'efficacité d'enzymes qui agissent contre ces antibiotiques. Deuxièmement, le taux de croissance des cellules bactériennes en biofilm est souvent ralenti, ce qui limite le pouvoir destructeur des antibiotiques dont le mode d'action dépend d'une activité métabolique cellulaire. Troisièmement, l'expression de gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques, tels que des enzymes de dégradation ou des

pompes membranaires, pourrait être surexprimée en biofilm. D'ailleurs, le partage de gènes de résistance serait augmenté en biofilm (Madsen et al., 2012), car le biofilm faciliterait un contact cellule-cellule pour le transfert horizontal de gènes (Lécuyer et al., 2018).

1.2. *Staphylococcus aureus*

S. aureus est une bactérie à Gram positif, anaérobie facultative. Il s'agit d'un organisme commensal de la peau et des muqueuses qui colonise naturellement environ 60% de la population de façon intermittente et 20-30% de la population de façon chronique (Kluytmans et al., 1997; Wertheim et al., 2005). Cependant, dans certains contextes, *S. aureus* peut devenir un pathogène opportuniste et causer une panoplie d'infections acquises en milieu nosocomial ou communautaire. À l'aide de son arsenal de facteurs de virulence, telles que des hémolysines, des protéases, des entérotoxines et des exotoxines du syndrome du choc toxique, elle est en mesure de causer plusieurs pathologies, d'éviter le système immunitaire de son hôte et d'inhiber l'activité de certains antibiotiques (Fair and Tor, 2014). *S. aureus* est également MDR, préoccupant les hôpitaux. La prévalence de la résistance à la méticilline est tellement importante au sein de l'espèce que l'on classifie maintenant les souches en deux groupes : les *S. aureus* susceptibles à la méticilline (SASM) et les *S. aureus* résistantes à la méticilline (SARM). La vancomycine, qui était longtemps utilisée comme traitement contre les SARM, devient également de plus en plus obsolète suite à l'apparition importante de *S. aureus* résistantes à la vancomycine (SARV) (Doulgeraki et al., 2017; Fair and Tor, 2014; Turner et al., 2019).

1.2.1. Le biofilm de *S. aureus*

Le biofilm de *S. aureus* et les facteurs impliqués dans les différentes étapes de la formation de son biofilm sont décrits dans les sections 1.2.1.1 à 1.2.1.2 et illustrés par la figure 1.3.

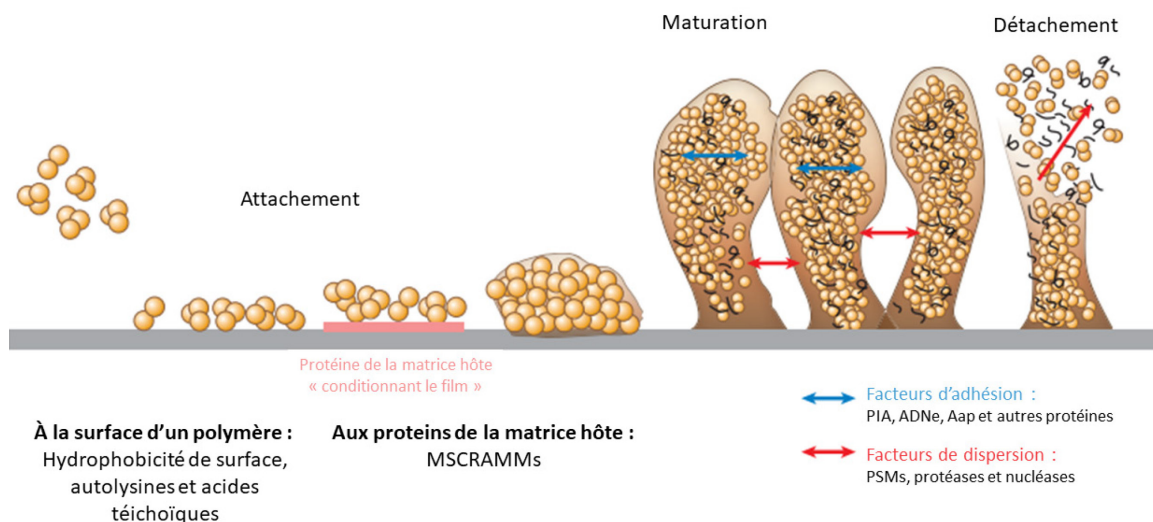


Figure 1.3 Différents facteurs impliqués dans les étapes de formation du biofilm de *S. aureus* (adaptée de Otto, 2013).

1.2.1.1. Attachement et microcolonie

S. aureus est capable de s'attacher à des surfaces abiotiques grâce à des forces physico-chimiques non spécifiques, telles que des interactions hydrophobes ou électrostatiques entre la surface du matériel et la surface de la bactérie (Otto, 2013). Cette adhésion repose principalement sur les charges de l'acide téichoïque qui compose la paroi cellulaire de *S. aureus* (Gross et al., 2001), ainsi que sur la production de certaines protéines de surface, telles que l'autolysine majeure AtlA (Biswas et al., 2006), la protéine associée au biofilm Bap (Cucarella et al., 2001) ou la protéine SpA (Henry-Stanley et al., 2011). *S. aureus* est également capable

de s'attacher à des surfaces biotiques, telles qu'aux protéines du plasma, de l'épithélium ou de l'endothélium de leur hôte. Cette adhésion se fait au niveau de protéines spécifiques, telles que les fibronectines, les fibrinogènes, le collagène, l'hémoglobine et bien d'autres, en exprimant un arsenal de protéines d'ancrage de surface partageant un motif LPXTG et appartenant à la famille des *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules* (MSCRAMMs) (Moormeier and Bayles, 2017; Patti et al., 1994).

Une fois attachée à une surface, *S. aureus* forme une microcolonie. Cette étape dynamique est marquée d'un évènement de dispersion précoce, appelé exode, qui servirait à restructurer le biofilm et coordonner l'expression des effecteurs du biofilm. Cette étape se passe généralement 6h à la suite de l'initiation de la croissance. Elle est caractérisée entre autres par une dégradation de l'ADN extracellulaire (ADNe) de l'environnement du biofilm. Le rôle biologique exact et les caractéristiques de l'exode sont cependant encore inconnus (Moormeier and Bayles, 2017).

1.2.1.2. Maturation et dispersion

La matrice du biofilm de *S. aureus* est constituée de protéines, d'ADNe et d'adhésine intercellulaire polysaccharidique (PIA), également reconnue sous le nom de sa composition chimique poly-N-acetylglucosamine (PNAG). La synthèse, la modification et le transport du PIA sont sous le contrôle de l'opéron *icaADBC*. La PIA est un important constituant de la matrice du biofilm de *S. aureus* pour l'adhésion cellule-cellule à l'intérieur de la matrice (Mack et al., 1996). Il ne serait pas essentiel cependant, puisque ce ne sont pas toutes les souches de *S. aureus* qui dépendent de ce polysaccharide malgré qu'elles possèdent l'opéron *ica* (O'Neill et al., 2007). Les souches de *S. aureus* sont donc classées selon qu'elles forment un biofilm PIA-dépendant ou PIA-indépendant. Pour l'adhésion intercellulaire dans le biofilm, les souches PIA-indépendantes auraient substitué

la PIA par des protéines d'adhésion formant de larges fibrilles, telles que la protéine associée à l'accumulation (Aap), la protéine de liaison à la matrice extracellulaire (Embp), Bap, SpA, la protéine de surface SasG et les protéines liant le fibrinogène FnbpA et FnbpB (Otto, 2013). La transcription de l'opéron *ica* est activée par une forte concentration de chlorure de sodium (NaCl) via le facteur sigma B (σ^B) (Cue et al., 2012; Fitzpatrick et al., 2005) et cette voie serait surtout utilisée chez les MSSA (McCarthy et al., 2015; O'Gara, 2007). Le glucose quant à lui induirait autant la voie PIA-dépendante qu'indépendante (Cue et al., 2012; Fitzpatrick et al., 2005). La voie PIA-indépendante serait surtout utilisée chez les MRSA (McCarthy et al., 2015; O'Gara, 2007). Ces deux phénotypes de biofilm sont illustrés par la figure 1.4 et la figure 1.5.

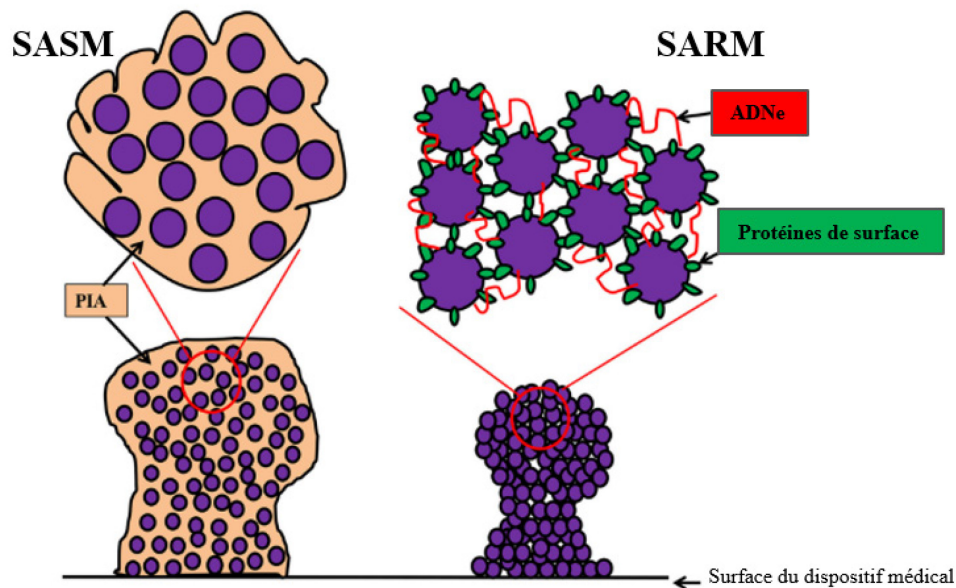


Figure 1.4 Représentation graphique des phénotypes typiques de biofilm de MSSA et de MRSA (adaptée de McCarthy et al., 2015).

La protéine SarA contribue à la formation du biofilm via la régulation transcriptionnelle de l'opéron *ica* (Beenken et al., 2004) et via la régulation

transcriptionnelle de Bap. SarA agit donc comme régulateur central de la formation du biofilm, autant pour les souches utilisant la voie PIA-dépendante que PIA-indépendante (O’Gara, 2007). Il existe cependant plusieurs autres facteurs qui peuvent affecter la transcription de la voie PIA-dépendante dépendamment des conditions environnementales présentes, dont certains sont décrits ensuite. IcaR est une protéine de la famille des régulateurs transcriptionnels TetR qui est transcrite indépendamment de l’opéron *ica*. C’est le répresseur principal de cet opéron (Jefferson et al., 2003) et la transcription d’IcaR est reconnue pour être inhibée par l’éthanol (Cue et al., 2012). SsrAB est un régulateur de l’opéron *ica* lorsque *S. aureus* est en condition anaérobie (Ulrich et al., 2007). Enfin, la protéine CcpA est également reconnue pour réguler positivement l’expression de l’opéron *ica* lorsque du glucose est présent en haute concentration dans la bactérie (Seidl et al., 2008).

La maturation puis la dispersion du biofilm de *S. aureus* sont médiées principalement par Agr, qui code pour un système de QS à deux composantes. Agr régule positivement l’expression de l’ARN-III de manière densité-dépendante en répondant à la présence d’un peptide auto-inducteur (AIP) (McCarthy et al., 2015), ce qui mène à la production de toxines et d’exo-enzymes de dégradation de la matrice du biofilm (Otto, 2013). Cependant, le système Agr n’affecterait pas la transcription des constituants de la matrice (O’Gara, 2007). Le système Agr est contrôlé par le régulateur accessoire SarA, qui contrôle négativement l’expression de l’ARN-III et contribue ainsi à la production du biofilm en retardant la dégradation de la matrice. Les différentes voies de régulation du biofilm de *S. aureus* sont illustrées par la figure 1.5.

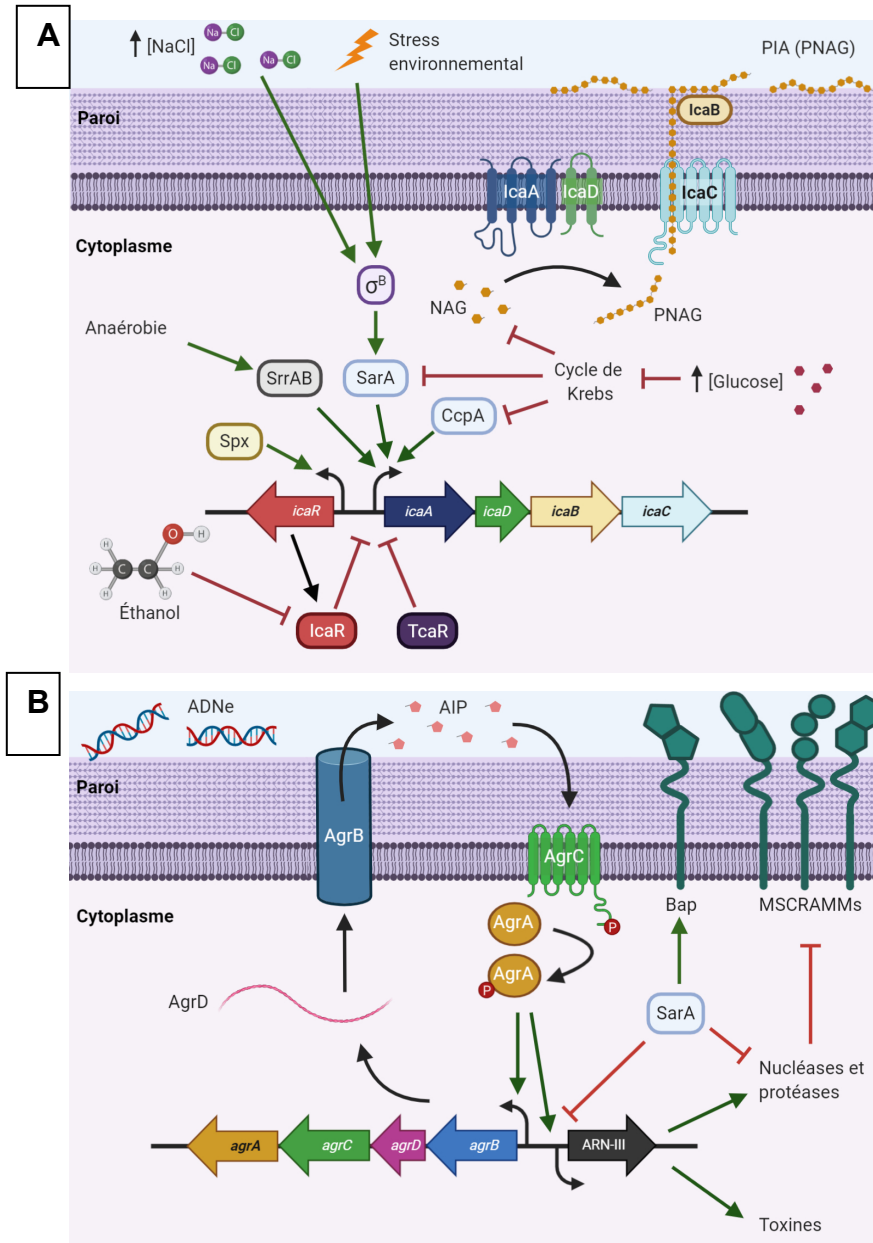


Figure 1.5 Mécanismes impliqués dans la formation du biofilm de *S. aureus*.
(A) Biofilm de type PIA-dépendant. **(B)** Biofilm de type PIA-indépendant.

La maturation du biofilm de *S. aureus* reste encore un processus complexe qui doit être encore approfondi. Tout récemment, Mlynek et al. (2020) a révélé une interaction entre la PIA et l'ADNe. Cet ADNe pourrait se lier alors aux lipoprotéines

de la matrice pour résister à la dispersion. Cette interaction PIA-ADNe-lipoprotéine serait sous le contrôle du régulateur transcriptionnel CodY. L'article soulève également l'idée que la composition de la matrice ne devrait pas être divisée en deux catégories (PIA-dépendant ou PIA-indépendant), puisque les souches PIA-indépendante possèdent tout de même l'opéron *ica* (Fitzpatrick et al., 2005) ni être systématiquement associée aux MSSA ou MRSA, car même si cette corrélation existe, il existe tout de même des exceptions à cette règle (O'Neill et al., 2007). Il faudrait plutôt parler de conditions favorables ou défavorables à l'expression d'un de ces phénotypes (Mlynek et al., 2020).

1.3. *Enterococcus faecalis*

E. faecalis est une bactérie à Gram positif, anaérobie facultative et ubiquitaire de l'eau, du sol et de nombreux animaux. Chez l'humain, elle est avant tout retrouvée comme organisme commensal qui colonise en faible abondance notre tractus gastro-intestinal, mais également le tractus urinaire, le tractus génital féminin et la cavité orale en faible proportion (Willett et al., 2019). *E. faecalis* produit plusieurs facteurs protéolytiques et lipolytiques, en plus de métaboliser le citrate, ce qui contribue à rehausser les qualités organoleptiques de certains produits alimentaires. Il produit également plusieurs bactériocines, ce qui en fait un probiotique intéressant. Pour ces qualités, il est souvent employé comme culture de fermentation de départ dans l'industrie laitière (Foulquié Moreno et al., 2006) et ne représente aucun problème pour une personne saine. Paradoxalement, *E. faecalis* est également un pathogène opportuniste en milieu hospitalier qui peut causer une panoplie d'infections potentiellement létales chez des patients susceptibles (Edmond et al., 1996). *E. faecalis* possède un haut niveau de tolérance à différents stress environnementaux, dont de hautes températures, de hautes concentrations en sel et des pH extrêmes (Fisher and Phillips, 2009; Flahaut et al., 1996). Lorsque traité comme pathogène, *E. faecalis* résiste sans

problème aux traitements par antibiotiques, grâce à une panoplie de facteurs de résistance intrinsèques ou acquis (Huycke et al., 1998; Wang et al., 2010). Les *Enterococcus* résistants à la vancomycine (ERV) sont d'ailleurs une priorité pour l'OMS et le *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) (Huycke et al., 1998; World Health Organisation, 2017). Sa persistance dans l'environnement ou dans le cas d'une infection est sans doute due à sa capacité de former du biofilm. Lors d'une co-infection, *E. faecalis* est reconnu pour être capable de former un biofilm polymicrobien avec certains organismes et leur procurer des avantages considérables, dont transmettre des gènes de résistance à la vancomycine à *S. aureus* (Ch'ng et al., 2019), tel qu'illustré par la figure 1.6.

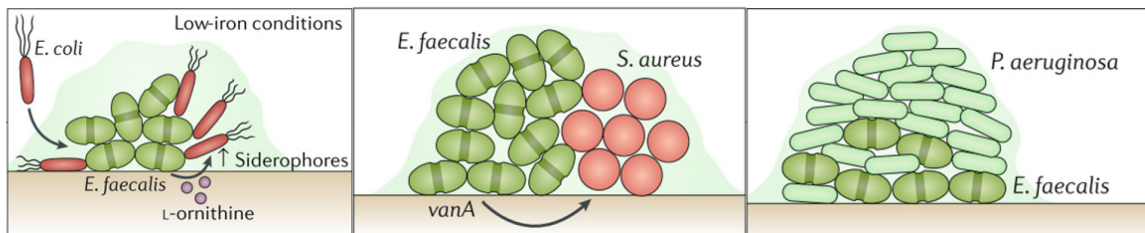


Figure 1.6 Formation de biofilm polymicrobien avec *E. faecalis* (adaptée de Ch'ng et al., 2019).

1.3.1. Historique de la caractérisation du biofilm de *E. faecalis*

Plusieurs travaux ont tenté d'élucider le mécanisme de formation de biofilm chez *E. faecalis*. Depuis le début des années 2000, plusieurs gènes et molécules ont été caractérisés comme essentiels à la formation du biofilm chez cet organisme, tel qu'*esp* (Tendolkar et al., 2004; Toledo-Arana et al., 2001), *fsr* et *gelE* (Hancock and Perego, 2004; Pillai et al., 2004), (p)ppGpp (Chávez de Paz et al., 2012) ou encore *ahrC* et *eep* (Frank et al., 2013, 2015). Malheureusement, bien que ces gènes et ces molécules semblent être des déterminants *in vivo* et/ou *in vitro* du biofilm, ils ne demeurent que des pièces de cet immense casse-tête. En effet,

aucune de ces études ne semble faire consensus parmi la communauté scientifique étudiant *E. faecalis* et encore récemment, des criblages génétiques étaient effectués pour caractériser la formation de biofilm chez cet organisme (Willett et al., 2019; Zheng et al., 2018) . Plusieurs chercheurs ont même décrit la difficulté d'identifier et caractériser une ou plusieurs voies centrales de formation du biofilm d'*E. faecalis*, dont les gènes essentiels à la formation du biofilm varient énormément entre les isolats et les types d'infections (Mohamed and Huang, 2007; Seneviratne et al., 2017).

1.3.2. Le biofilm d'*E. faecalis*

Le biofilm de *E. faecalis* et les facteurs impliqués dans les différentes étapes de la formation de son biofilm sont décrits dans les sections 1.3.2.1 à 1.3.2.2 et illustrés par la figure 1.7.

1.3.2.1. Attachement et microcolonie

Plusieurs facteurs contribuent à l'attachement initial *in vivo* et/ou *in vitro* lors de l'établissement du biofilm, dont le pilus Ebp associé au biofilm, le glycolipide BgsA ainsi que les adhésines Agg, Esp et Ace. Leur contribution dépend majoritairement du type de surface et cibler un seul de ses facteurs s'est avéré inefficace pour abroger l'initiation du biofilm (Ch'ng et al., 2019).

Une fois adhérees, les cellules d'*E. faecalis* forment une microcolonie, étape précurseur à l'établissement du biofilm mature. À cette étape, *E. faecalis* mobilise majoritairement des glycosyltransférases Epa, qui produisent les rhamnopolysaccharides impliqués dans la formation de la membrane cellulaire (Ch'ng et al., 2019). Ce processus est accéléré considérablement lorsque des antibiotiques sont présents dans le milieu, car ceux-ci induisent l'activation de

voies régulatrices de réponses aux stress qui permettent la transcription de l'opéron *epaOX* (Dale et al., 2017).

1.3.2.2. Maturation et dispersion

Les voies de régulation via le QS responsables de déclencher l'expression des gènes de la matrice sont encore mal comprises à ce jour. Trois systèmes de QS pouvant stimuler la formation du biofilm ont été identifiés, mais aucun n'est systématiquement activé dans tous les cas d'infection. Le premier système implique la protéase membranaire Eep qui reconnaît des phéromones et déclenche une cascade de signalisation qui active les voies de résistances aux stress environnementaux, dont potentiellement la formation du biofilm (Frank et al., 2013). Eep aurait également un effet sur le régulateur transcriptionnel AhrC, contribuant positivement à la formation du biofilm dans le cas d'endocardites et d'infection de cathéters (Frank et al., 2013). La seconde voie de QS impliquée dans la production de la matrice fait intervenir le système Fsr. Le peptide FsrB est sécrété dans l'environnement par *E. faecalis* et lorsque la densité cellulaire atteint un certain seuil, la protéine kinase FsrC reconnaît l'accumulation de FsrB et transduit un signal à FsrA. Cette dernière active alors différents opérons, dont *bopABCD*, *ebpABC*, *gelE* et *sprE* (Ali et al., 2017; Ch'ng et al., 2019). Enfin, l'implication de l'*autoinducer 2* (AI-2) produits par LuxS est une troisième voie de QS liée à la régulation transcriptionnelle de produits de la matrice du biofilm chez *E. faecalis*, bien que son implication demeure encore mal comprise (Ali et al., 2017).

La matrice du biofilm mature de *E. faecalis* est composée d'ADNe, de polysaccharides, d'acide lipotéichoïque (LTA) et de protéases extracellulaires. L'ADNe forme des structures filamenteuses intercellulaires et contribue à la stabilité générale de la matrice. Son relâchement des cellules encore

métaboliquement actives est permis par l'autolysine AtlA. Cependant, la présence d'AtlA ne serait pas essentielle au biofilm, puisqu'elle n'est pas requise dans le cas d'une infection du tractus urinaire (Frank et al., 2013). Les glycoprotéines et les polysaccharides de la matrice contribuent au développement global du biofilm. Le régulateur transcriptionnel putatif se liant aux sucres BopD, régulé par le système Fsr, est directement lié à la formation du biofilm, lorsque du maltose est disponible dans l'environnement (Hufnagel et al., 2004). La production de LTA est régulée par l'opéron *dltABCD*. Enfin, la gélatinase GelE et la sérine protéase SprE modulent la maturation du biofilm en digérant les composantes de la matrice pour faciliter le détachement du biofilm et la dispersion des cellules (Thomas et al., 2008).

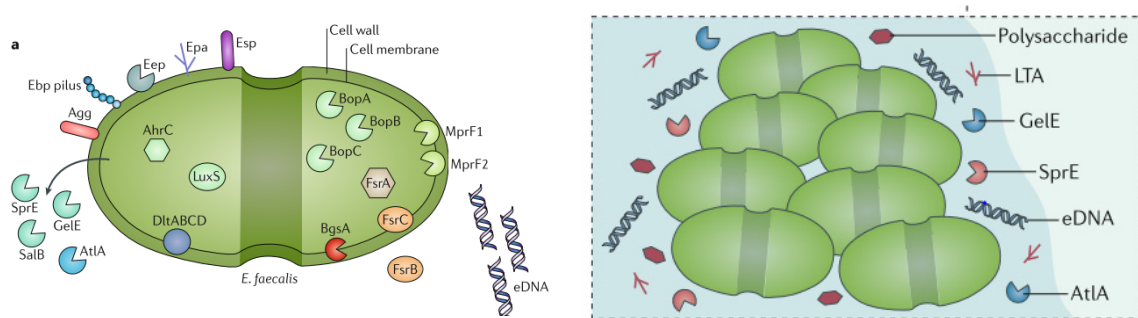


Figure 1.7 Facteurs impliqués dans la formation du biofilm chez *E. faecalis* (adaptée de Ch'ng et al., 2019). **(A)** Les facteurs impliqués dans l'adhésion, la formation de la microcolonie et la régulation transcriptionnelle des déterminants de la matrice via le QS. **(B)** Les facteurs composant la matrice du biofilm.

1.4. Les nouvelles stratégies anti-biofilm

La difficulté de déceler rapidement et efficacement la bactérie responsable de l'infection d'un implant biomédical, l'augmentation croissante de pathogènes MDR, la résistance intrinsèque des biofilms aux traitements antibiotiques généraux

actuellement utilisés, ainsi que l'éventualité d'être en présence du biofilm polymicrobien, entraînent le besoin criant de trouver de nouvelles stratégies pour limiter les infections chroniques des implants biomédicaux. La figure 1.8 résume de façon schématique les différentes stratégies qui existent pour limiter la production de biofilms nuisibles en milieu hospitalier.

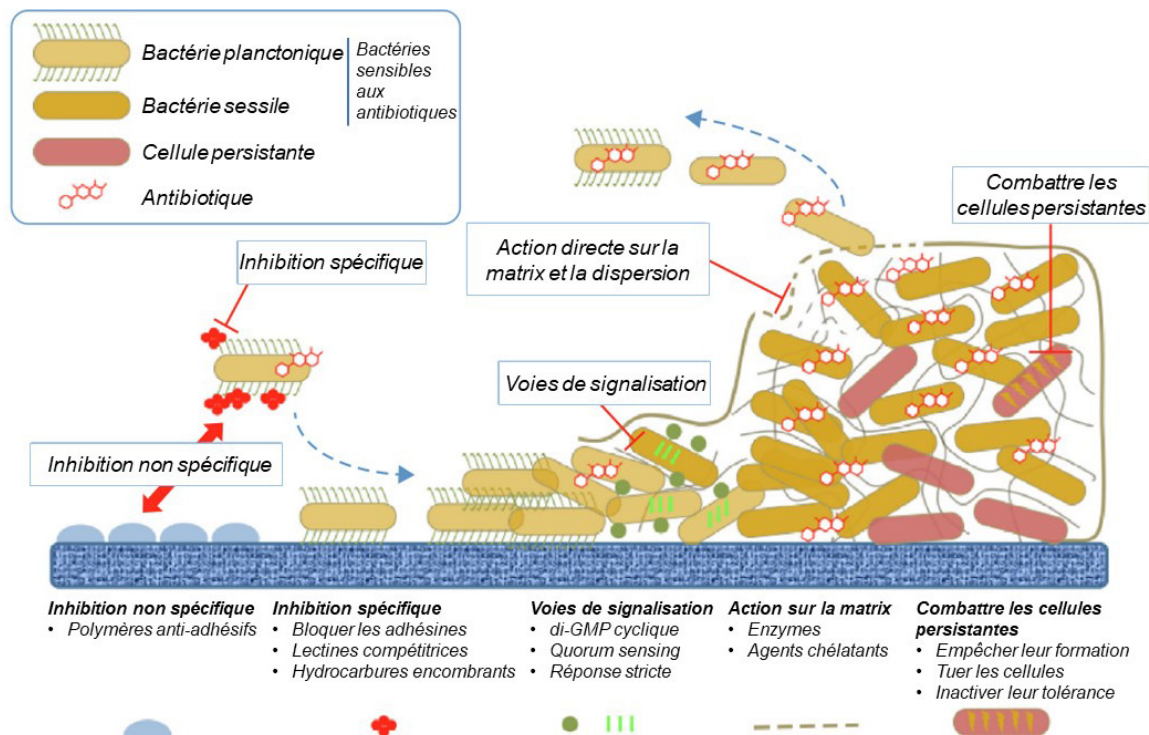


Figure 1.8 Représentation schématique des différentes stratégies anti-biofilm existantes (adaptée de Beloin et al., 2014).

1.4.1. Inhiber l'attachement

L'étape de l'attachement étant cruciale pour l'établissement et le développement d'un biofilm, une première stratégie est de limiter l'adhésion des bactéries aux surfaces des implants biomédicaux, de façon spécifique ou non spécifique.

L'utilisation des molécules ciblant les adhésines bactériennes (Beloin et al., 2014; Khatoon et al., 2018) spécifiques aux pathogènes d'une infection représente une manière directe de les contrer. Certaines approches bio-industrielles se concentrent plutôt sur le développement de matériaux médicaux avec des propriétés non adhésives, couplés avec des propriétés bactériostatiques, en rajoutant une couche d'hydroxyapatite, d'antibiotiques, d'antiseptiques, de composés photosensibles ou encore de nanoparticules de certains métaux, par exemple. Il est également possible de modifier les polymères composant ces matériaux pour leur conférer des propriétés physiochimiques anti-adhésives (Chen et al., 2013). Un matériau composé d'esters et de fragments d'hydrocarbures cycliques s'est déjà avéré efficace pour limiter significativement l'attachement *in vitro* et *in vivo* de *S. aureus* chez la souris (Hook et al., 2012). Ces deux alternatives font partie des méthodes indirectes de prévention de l'attachement bactérien.

1.4.2. Cibler les cellules persistantes

Les cellules persistantes sont des cellules bactériennes en état de dormance qui démontrent un métabolisme grandement ralenti, leur permettant de résister à divers stress environnementaux (Jolivet-Gougeon et Bonnaure-Mallet, 2014). Par conséquent, leur activité métabolique diminuée leur permet de résister à des concentrations 1000 fois plus importantes que la CMI normale de certains antibiotiques qui ciblent la prolifération ou le métabolisme de ces organismes (Beloin et al., 2014). Les cellules persistantes apparaissent particulièrement lors d'un stress nutritionnel. La réponse à ce stress et la formation des cellules persistantes sont médiées par un système de régulation métabolique complexe, contrôlé par l'effecteur ppGpp (Amato et al., 2014). Développer une combinaison thérapeutique modulant le ppGpp pourrait prévenir la formation des cellules persistantes et réduire les concentrations d'antibiotique requises pour éliminer un biofilm (Beloin et al., 2014). Le mécanisme du ppGpp en réaction au stress chez

les bactéries à Gram positif est plus nébuleux que chez les bactéries à Gram négatif (Corrigan et al., 2016), mais la neutralisation de cette molécule pourrait également aider à réduire la formation du biofilm chez des bactéries à Gram positif, telle que *E. faecalis* (Chávez de Paz et al., 2012). D'autres stratégies consistent à exploiter la faible activité métabolique des cellules persistantes pour les tuer spécifiquement dans le biofilm, en induisant des espèces réactives de l'oxygène qui ne pourront pas être transformées par les cellules persistantes (Lebeaux et al., 2014), ou encore en surutilisant certaines protéases (Beloin et al., 2014).

1.4.3. Couper la communication bactérienne

La communication bactérienne via le QS est une étape clé pour la production de la matrice du biofilm après l'établissement d'une microcolonie. Il est déjà reconnu que l'utilisation d'analogues des molécules signalisatrices des systèmes majeurs de QS, communs à la plupart des bactéries, réduit la formation du biofilm. Ces analogues font compétition pour les sites de liaisons des récepteurs du QS, tels que les récepteurs aux acylhomosérines lactones ou à l'A1-2 des Gram négatifs et aux AIP ou à l'ARN-III des Gram positifs. En plus de ces molécules, d'autres messagers, tels que le c-di-GMP, peuvent être également ciblés et dégradés directement par différents composés, par exemple des macrolides ou des hydrolases, afin de couper la communication bactérienne (Beloin et al., 2014; Høiby et al., 2010a; Lebeaux et al., 2014).

1.4.4. Dégrader les constituants de la matrice

L'éradication du biofilm en ciblant les constituants de la matrice est une nouvelle approche. L'ADNe et certains polysaccharides de la matrice extracellulaire pourraient être ciblés par des enzymes afin de promouvoir la dispersion du biofilm et retourner les cellules dans leur état planctonique, les exposants davantage au

système immunitaire. Cette approche ne couvre malheureusement pas un large spectre de biofilms et est très à risque de développer des résistances (Lebeaux et al., 2014). La matrice pourrait également être dispersée de force par des manières physiques en utilisant des champs électromagnétiques ou des ultrasons, mais ces méthodes nécessitent encore des recherches cliniques pour être implantées (Lewis, 2001).

1.4.5. Utiliser des combinaisons thérapeutiques

Enfin, une cinquième stratégie anti-biofilm serait de découvrir et d'utiliser de nouveaux antibiotiques plus efficaces pour pénétrer la matrice. Cependant, cette stratégie comporte toujours un risque d'évolution des résistances microbiennes. À défaut d'être capable de trouver des thérapies à stratégie unique qui n'entraînent aucune évolution de résistance, il faudrait utiliser des combinaisons thérapeutiques pour améliorer l'effet des drogues actuelles et limiter le développement de ces résistances (Dijlts et al., 2020). Ces combinaisons thérapeutiques devraient être aptes à limiter le développement de biofilm et tuer plus efficacement les pathogènes, de façon non spécifique.

1.5. Hypothèse de recherche et objectifs

Différentes observations sur les adaptations cellulaires entreprises lors de la formation du biofilm chez plusieurs espèces bactériennes ont mené à l'hypothèse qu'une adaptation cellulaire centralisée parmi les différentes espèces de bactéries à Gram positif pourrait réguler le passage des cellules d'un mode de vie planctonique vers un mode de vie communautaire en biofilm.

1.5.1. L'adaptation cellulaire en biofilm

Une récente étude s'est intéressée au remodelage des voies cellulaires chez la bactérie à Gram positif *B. subtilis* lors de la formation de son biofilm (Pisithkul et al., 2019). À l'aide d'une approche intégrant de la transcriptomique, de la protéomique et de la métabolomique, ils ont révélé de vastes altérations métaboliques lors des premiers stades de développement de son biofilm. Les voies cellulaires associées à la génération d'énergie, telles que le cycle de Krebs ou le catabolisme du glycérol, ainsi que les voies de biosynthèse des nucléotides, des acides aminés, des métabolites secondaires et de la matrice extracellulaire, étaient les plus fortement régulées positivement dans leur étude. De plus, plusieurs de ces voies n'avaient jamais été associées à la formation du biofilm. Les conclusions de cette étude sont illustrées graphiquement par la figure 1.9.

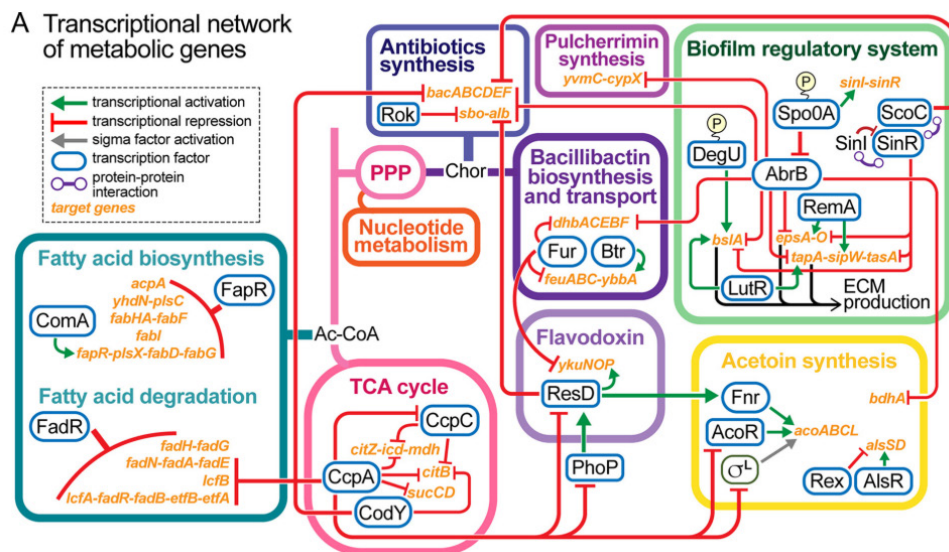


Figure 1.9 Voies métaboliques subissant un remodelage lors de la formation du biofilm de *B. subtilis* (tirée de Pisithkul et al., 2019).

Une autre étude parue au début de l'année 2020 s'est également intéressée aux changements physiologiques de la bactérie à Gram positif *Bacillus cereus* lors de la formation de son biofilm (Caro-Astorga et al., 2020). Une approche par transcriptomique et protéomique a révélé que la population bactérienne en biofilm se différencie métaboliquement et entreprend de remanier les voies métaboliques des nucléotides, des sucres, des acides aminés, de la production de métabolites secondaires, la biosynthèse des composantes extracellulaires de la matrice et de la production d'énergie, de façon similaire à *B. subtilis*. Les gènes associés à la voie de biosynthèse *de novo* des purines étaient d'ailleurs fortement surexprimés durant le début de formation du biofilm selon leur étude du transcriptome, tout comme les produits de ces gènes selon leur étude du protéome.

Les conclusions de Pisithkul et al., 2019 et de Caro-Astorga et al., 2020 ont servi de point de référence pour l'étude du transcriptome, car de telles études n'ont jamais été entreprises chez *S. aureus* et *E. faecalis*. Plusieurs spéculations et observations portent à croire que les mêmes voies cellulaires ayant subi des réorganisations entre les cellules planctoniques et les cellules en biofilm chez *B. subtilis* et *B. cereus* pourraient également être régulées chez les deux genres bactériens d'intérêt de cette étude.

Par exemple, il fut observé que certaines voies cellulaires majeures chez *S. aureus*, telles que le cycle de Krebs, étaient grandement modulées lors de la formation du biofilm (Zhu et al., 2009). Dans leur revue de la littérature, Moormeier et Bayles (2017) remarquent une expression différentielle de l'opéron de l'acide acétique, de certains métabolites secondaires et de gènes dans le métabolisme du pyruvate lors de l'étape de formation de la microcolonie de *S. aureus* et soulèvent l'idée que des mécanismes distincts, complexes et centraux sont impliqués dans la différenciation métabolique lorsque cette bactérie forme son biofilm suite à l'étape d'exode. Également chez *S. aureus*, des analyses du métabolome de plusieurs isolats ont signalé des adaptations métaboliques similaires entre le passage de culture planctonique à biofilm de ces différentes

souches (Ammons et al., 2014). Chez *E. faecalis* comme chez *S. aureus*, les cellules en biofilm adoptent souvent une respiration anaérobie ou microaérophile qui diffère des cellules planctoniques (Tendolkar et al., 2006; Zhu et al., 2007a).

Une meilleure compréhension des procédés cellulaires conservés lors de la formation du biofilm chez les Gram positifs pourrait donc mener à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques prévenant ou modulant l'adaptation cellulaire bactérienne menant à la formation du biofilm de pathogènes problématiques, tels que *S. aureus* et *E. faecalis*, qui cause de nombreux problèmes en milieu hospitalier. En utilisant plusieurs souches bactériennes et différents milieux de culture, il serait possible de mettre en évidence des gènes centraux impliqués dans la formation du biofilm à l'aide d'une étude du transcriptome de ces bactéries en biofilm en comparaison avec leur mode de vie planctonique. Ces gènes pourraient servir de cible pour empêcher ou réduire la formation de biofilm *in vivo* et ainsi créer un système d'éradication généralisé du biofilm. Cette étude a donc trois objectifs :

- 1) Caractériser la dynamique de formation du biofilm de plusieurs souches d'intérêt dans différents milieux inducteurs de biofilm.
- 2) Analyser le transcriptome à l'aide d'une analyse d'enrichissement d'un groupe de gène (GSEA) et par homologie de séquence en distinguant des voies cellulaires communes entre *S. aureus* et *E. faecalis*.
- 3) Valider les gènes candidats à l'aide d'une approche par PCR quantitative (qPCR), ainsi que par vérification phénotypique avec des mutants et des drogues.

1.5.2. La transcriptomique du biofilm des bactéries de l'étude

Quelques-uns des gènes ou voies cellulaires impliquées dans le métabolisme central de formation du biofilm chez *Bacillus* avaient aussi été observées dans des études transcriptomiques, métabolomiques et/ou protéomiques chez *S. aureus*

(Ammons et al., 2014; Liu et al., 2018; Resch et al., 2005, 2006; Stipetic et al., 2016). Notons entre autre que des modulations en biofilm du métabolisme du carbone, du métabolisme secondaire, du métabolisme d'acides aminés et d'acides nucléiques se retrouvent dans plusieurs de ces études. Cependant, ces adaptations cellulaires ne sont généralement pas examinées plus en détail dans ces études. En effet, plusieurs des gènes ou produits fonctionnels identifiés n'avaient jamais été associés au processus de formation d'attachement ou de maturation du biofilm. Ils étaient donc brièvement discutés dans le volet perspective de ces études. De plus, ces dernières s'effectuaient majoritairement dans des conditions d'infection *in vivo* ou dans des conditions de réponse à un stress environnemental précis. Les adaptations cellulaires métaboliques qui nous intéressent n'étaient donc pas aussi fortement modulées que d'autres processus plus spécifiques à leurs conditions d'étude, durant la formation du biofilm. Chez *E. faecalis*, de telles études sont beaucoup plus rares, mais certaines adaptations cellulaires ont également été rapportées lors de la formation du biofilm (Seneviratne et al., 2017; Suryaetha et al., 2019). Ces observations supportent notre hypothèse sur la présence d'un remodelage métabolique conservé lors de la formation du biofilm chez plusieurs espèces de bactéries à Gram positif.

1.5.3. La voie de biosynthèse des purines

L'une des voies les plus prometteuses pour être régulée positivement lors de la formation du biofilm chez les Gram positifs est la voie de biosynthèse *de novo* des purines. Le 5-phosphoribosyl- α -1-pyrophosphate (PRPP) est l'intermédiaire central du métabolisme des purines, autant pour la biosynthèse *de novo* que la voie de sauvetage, mais est également requis pour la biosynthèse des coenzymes nicotinamides (NAD⁺ and NADP⁺) et les acides aminés histidine et tryptophane. Le PRPP est formé à partir du transfert d'un phosphate provenant de l'ATP sur un ribose-5-phosphate (R5P), catalysé par la PRPP synthase (Kilstrup et al., 2005).

Lorsque le PRPP est en haute concentration dans la cellule, le régulateur PurR se détache de la région promotrice de l'opéron *purEK[B]CQSLFMNH(J)D*, ce qui permet sa transcription. PurR est donc un répresseur constitutif de la voie des purines chez la plupart des bactéries (Kilstrup et al., 2005). Le terme *purH(J)* de l'opéron *pur* désigne ici un gène encodant pour une enzyme bifonctionnelle (Ebbole and Zalkin, 1989; Shi et al., 2014) tandis que le gène *purB*, entre crochets, n'est pas toujours situé sur l'opéron *pur*, comme c'est le cas chez *E. faecalis* (Kilstrup et al., 2005). Une autre particularité de *E. faecalis* est qu'il possède deux copies de la sous-unité ATPase de la 5-aminoimidazole ribonucleotide (AIR) carboxylase, soit *purK1* et *purK2*, mais il n'est pas connu si les deux gènes sont fonctionnels (Kilstrup et al., 2005). Le gène *purA*, responsable de la production de l'adénine, est également indépendant de l'opéron *pur*. Lorsque l'adénine est présente en haute concentration, PurR vient plutôt réprimer la transcription de l'opéron *pur*, tel qu'illustré par la figure 1.10. Les deux voies possibles de la biosynthèse des purines, soit la voie *de novo* et la voie de sauvetage, sont décrites plus en détail dans les sections 1.5.1 à 1.5.3, et différenciées par la figure 1.11.

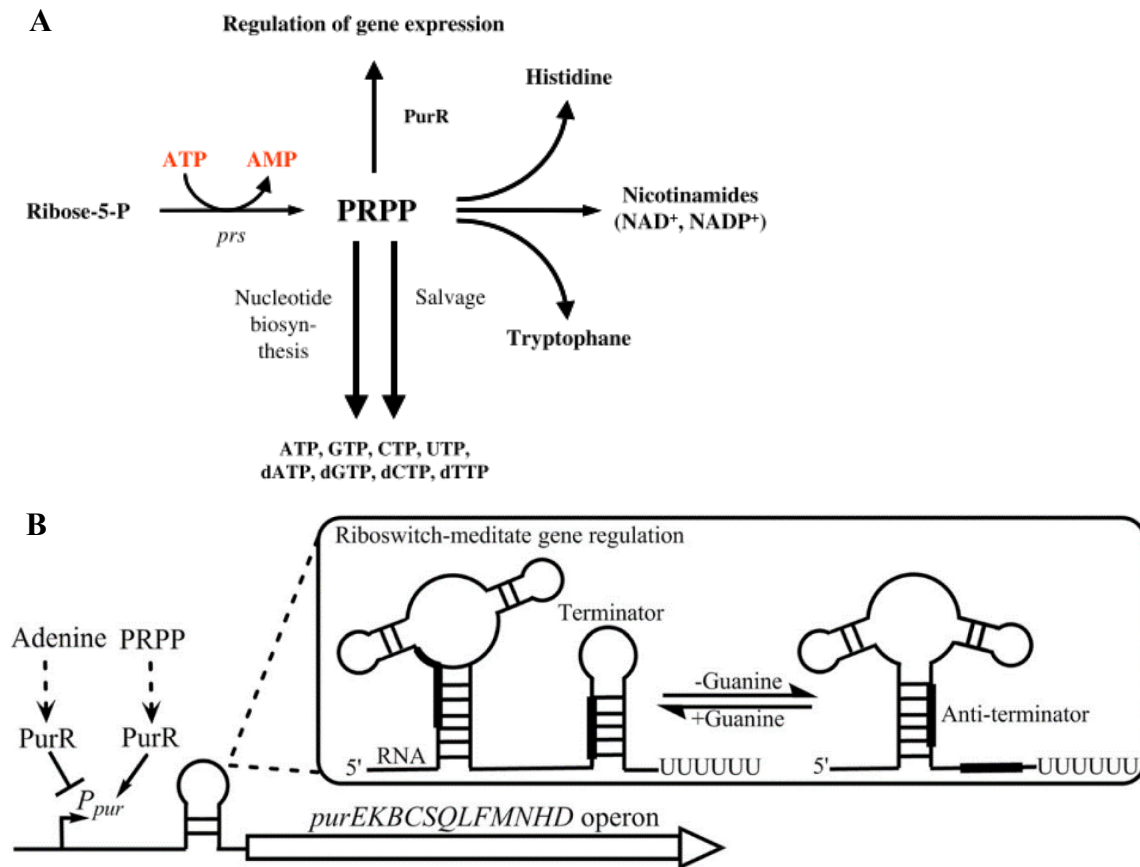


Figure 1.10 Implication du PRPP dans la voie de biosynthèse des purines. (A) Biosynthèse et utilisation du PRPP (tirée Kilstrup et al., 2005). (B) Régulation de la voie de biosynthèse *de novo* des purines (adaptée de Shi et al., 2014).

1.5.3.1. Voie de biosynthèse *de novo* de l'IMP

La voie de biosynthèse *de novo* des purines nécessite la synthèse de l'inosine monophosphate (IMP) à partir du PRPP. Il s'agit d'une réaction en dix étapes faisant intervenir l'ensemble des douze gènes de l'opéron *pur*, illustré par la figure 1.10. L'enzyme amidophosphoribosyltransferase codée par *purF*, qui catalyse la première réaction de la voie métabolique, est conservée chez toutes les bactéries, tout comme la phosphoribosylamine--glycine ligase codée par *purD*, qui convertit

le 5'-phosphoribosylamine (PRA) en glycineamide ribonucleotide (GAR). Plusieurs autres gènes de la voie des purines seraient également conservés au sein des bactéries (Gil et al., 2004; Kilstrup et al., 2005). De tous les gènes de la voie de biosynthèse *de novo* de l'IMP, *purF* serait le plus étudié et le mieux caractérisé. Chez *B. subtilis*, ce gène est inhibé rétroactivement par la présence d'AMP et de GMP (Wong et al., 1981) et durant la phase stationnaire de croissance, son enzyme peut être déstabilisée par la présence d'oxygène (Turnbough and Switzer, 1975). Certains indices suggèrent que le (p)ppGpp pourrait également jouer un rôle stabilisateur chez cette enzyme (Switzer et al., 1985). La voie métabolique du réservoir de carbone par le folate intervient deux fois durant la synthèse de l'IMP. La première fois durant la conversion du glycinamide ribonucléotide (GAR) en phosphoribosyl-N-formylglycineamide (FGAR) par *purN* puis durant la conversion du 5'-phosphoribosyl-5-aminoimidazole-4-carboxamide (AICAR) en 5-formamidoimidazole-4-carboxamide ribonucléotide (FAICAR) par *purH* (Kilstrup et al., 2005).

1.5.3.2. Voie de biosynthèse des purines

La biosynthèse des purines consiste à transformer l'IMP en adénosine monophosphate (AMP) et guanosine monophosphate (GMP). L'amination de l'IMP en AMP est catalysée par deux réactions : l'adenylosuccinate synthétase (codée par *purA*) convertit d'abord l'IMP en succinyl-AMP, puis cette molécule est transformée en AMP par l'adenylosuccinate lyase (codée par *purB*). Ce dernier gène est également retrouvé dans la voie de biosynthèse *de novo* de l'IMP et converti l'AICAR en FAICAR, puis en IMP. L'adénylate kinase (*adk*) converti l'AMP et l'ATP en deux molécules d'adénosine diphosphate (ADP).

La synthèse du GMP passe d'abord par l'oxydation de l'IMP en XMP par GuaB. L'XMP est ensuite convertie en GMP par GuaA en utilisant le groupement amide

de la glutamine. Chez *Escherichia coli*, autant l'AMP que la GMP peuvent être inhibées par le ppGpp, mais ce phénomène n'a pas été caractérisé chez les Gram positifs. La guanylate kinase (*gmk*) convertit le GMP et l'ATP en une molécule d'ADP et une molécule de guanosine diphosphate (GDP) (Kilstrup et al., 2005).

1.5.3.3. Voie de sauvetage des purines

Ce ne sont pas toutes les bactéries qui sont capables de synthétiser *de novo* des purines. Elles sont donc auxotrophes pour le GMP et l'AMP et nécessitent d'être capables de dégrader les acides nucléiques de leur environnement pour être capables d'obtenir ces nucléotides nécessaires à leur survie. Cependant, l'AMP et le GMP ne peuvent pas être incorporés directement dans les cellules bactériennes et doivent être déphosphorylés à l'extérieur de la cellule en nucléosides, puis transportés à l'intérieur de la cellule via un transporteur du type ABC. Enfin, les nucléosides sont soit phosphorylés par une kinase en nucléotide ou dégradés par une nucléoside phosphorylase ou une hydrolase en base nucléique (adénine ou guanine). La base des nucléosides est enfin convertie en AMP ou GMP par une phosphoribosyltransférase. Ces bases nucléiques peuvent également être directement transportées dans la cellule pour reformer l'AMP et le GMP. Enfin, la xanthine ou l'hypoxanthine peuvent également être importées dans la cellule pour reformer de l'IMP ou du XMP et reprendre la voie de biosynthèse des purines telle que décrite dans la section 1.5.2. (Kilstrup et al., 2005).

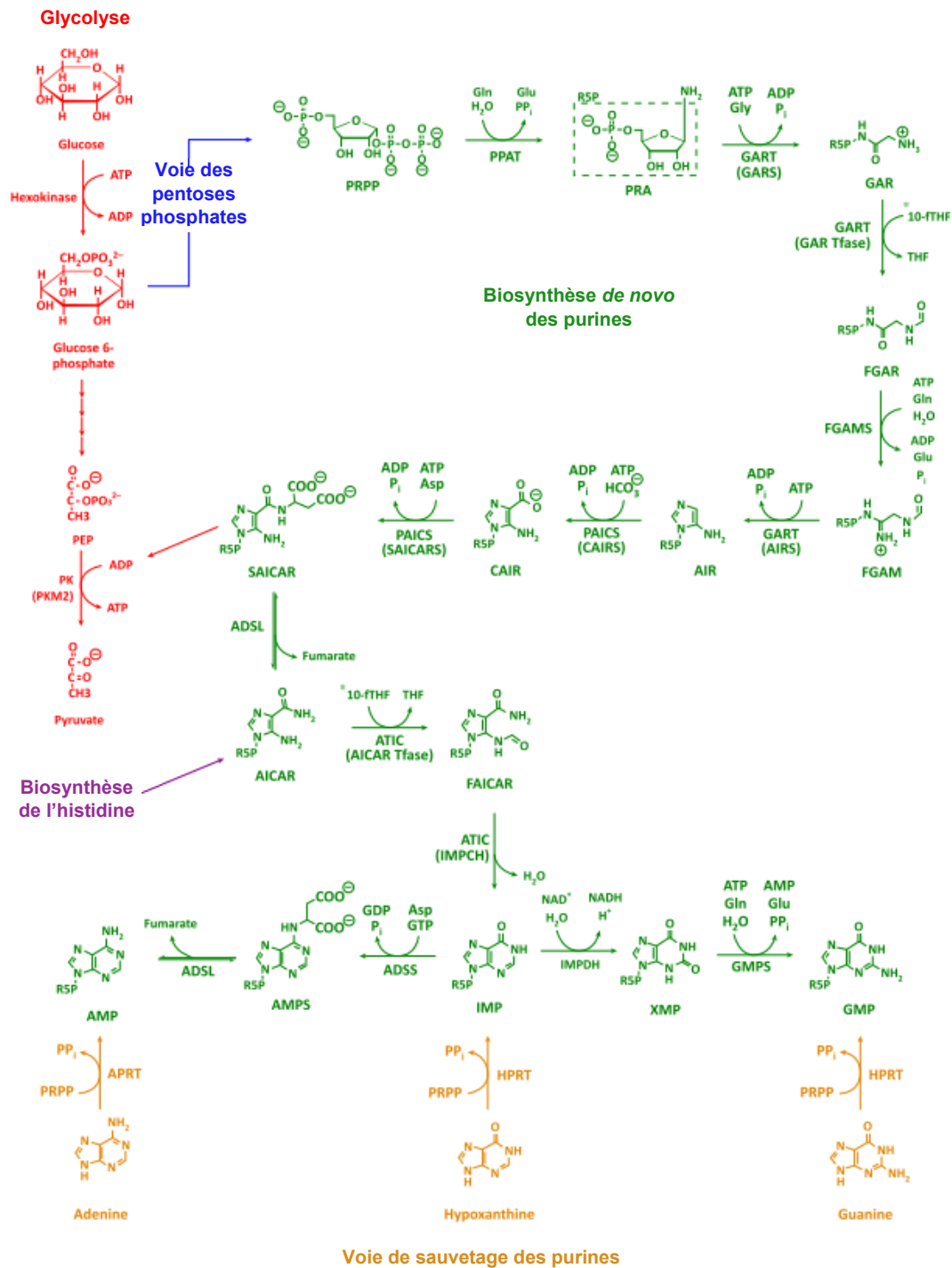


Figure 1.11 Voies métaboliques de biosynthèse des purines (adaptée de Pedley and Benkovic, 2017).

1.5.4. Les souches de références de l'étude

La souche *S. aureus* USA300 serait apparue au début des années 2000 aux États-Unis et aurait été caractérisée en 2003 (Tenover and Goering, 2009). Il s'agit de la MRSA acquise dans la communauté la plus prévalente aux États-Unis (McDougall et al., 2003) et la cause de plusieurs infections nosocomiales sévères dans ce pays, particulièrement dans les infections de la peau et des tissus mous (Thurlow et al., 2013). Elle serait maintenant répandue internationalement (Nimmo, 2012). Il faut toutefois noter que USA300 n'est pas un clone unique, mais regroupe plutôt une famille de souches isolées qui partage au-dessus de 80% de similitude dans leur patron de gel d'électrophorèse en champ pulsé (Tenover and Goering, 2009). Au Canada, par exemple, USA300 est connue sous le nom CMRSA-10 (Nimmo, 2012). USA300 est reconnue pour être hypervirulente et sécréter une panoplie de toxines (Tenover and Goering, 2009). Sa persistance lors d'une infection est principalement due à ses multiples facteurs de résistances aux antibiotiques (l'érythromycine et la tétracycline, par exemple), sa sensibilité réduite à la vancomycine et à la daptomycine (Tenover and Goering, 2009), ainsi qu'à sa capacité de former du biofilm, qui est du type PIA-indépendant (Moormeier et al., 2014). Enfin, l'importance clinique de USA300 ne cesse de croître et un modèle mathématique récent suggère même qu'USA300 deviendra la souche la plus prédominante en hôpital aux États-Unis dans un futur proche (D'Agata et al., 2009).

La souche *S. aureus* SH1000 est une dérivée de la souche modèle MSSA NCTC 8325, également appelée RN1. Cette dernière est la souche de référence pour les études en laboratoire sur la régulation des gènes, la réplication des plasmides, le comportement des prophages, la structuration de la paroi, la composition de la membrane, la physiologie et la résistance aux antibiotiques de l'espèce *S. aureus* (Herbert et al., 2010). La souche SH1000 a été débarrassée aux rayons ultraviolets des prophages $\phi 11$, $\phi 12$ et $\phi 13$, puis réparée au niveau de la délétion de 11 paires

de bases (pb) du gène de régulation *rsbU*. Une caractéristique notable du rétablissement de ce gène est d'augmenter significativement la production de biofilm (Herbert et al., 2010). Ce biofilm est reconnu comme étant PIA-dépendant (Fitzpatrick et al., 2005; You et al., 2014). En comparant le génome de SH1000 (numéro d'accèsion d'assemblage GenBank le plus récent : GCA_002201725.1) avec la souche ancestrale NCTC 8325 (numéro d'accèsion NC_007795), en plus des différences génotypiques induites lors de la construction de la souche, 15 polymorphismes nucléotidiques (SNP) et une délétion de 63 pb en amont du gène *spa* ont été retrouvés chez SH1000 (O'Neill, 2010). Les auteurs de cette étude recommandent donc de considérer ces différences génotypiques lors d'une analyse transcriptomique. Ces dernières ne sont toutefois pas assez notables pour risquer d'impacter significativement les analyses bio-informatiques de SH1000 alignée sur le génome de NCTC 8325.

E. faecalis V583 provient d'un isolat clinique d'un échantillon de sang d'un patient ayant une infection urinaire et dont les traitements à la vancomycine n'avaient pas fonctionné. Il s'agissait de l'une des premières souches d'*E. faecalis* résistant à la vancomycine rapportée en Amérique du Nord (Sahm et al., 1989). Elle a été caractérisée phénotypiquement en 1987, puis séquencée en 2003 (Paulsen, 2003), sous le numéro d'accèsion NC_004668. La souche V583 est maintenant couramment utilisée en laboratoire et est devenue la souche de référence pour l'espèce.

E. faecalis ATCC 29212 a été initialement isolée d'un échantillon d'urine humain aux États-Unis et est couramment utilisée comme souche de laboratoire depuis 1985. Son génome a été séquencé puis annoté et est accessible à l'aide du numéro d'accèsion NZ_CP008816 (Minogue et al., 2014). Contrairement à V583, elle est susceptible à la vancomycine (Swenson et al., 1995).

CHAPITRE 2

ARTICLE SCIENTIFIQUE

2.1. Introduction de la publication

2.1.1. Résumé de l'article

Les biofilms bactériens impliqués dans les infections chroniques confèrent de 10 à 1000 fois plus de résistance aux antibiotiques, entraînant souvent des complications sévères et l'échec des traitements prodigués. Certaines bactéries à Gram positif semblent différentiellement exprimer des voies métaboliques en biofilm, lorsque comparé avec la forme planctonique. Cette adaptation du métabolisme central pourrait donc jouer un rôle crucial lors de la formation du biofilm par les bactéries à Gram positif *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis*, les pathogènes les plus prévalents dans le cas d'infection d'implants biomédicaux. Dans cette étude, nous utilisons une approche transcriptomique pour identifier les voies cellulaires qui sont modulées de façon commune lors de la formation du biofilm de ces deux bactéries. Une analyse d'enrichissement d'un groupe de gènes différentiellement exprimés, provenant du transcriptome de quatre souches différentes de bactérie à Gram positif, a permis d'identifier trois voies cellulaires surexprimées de façon commune durant la formation du biofilm : la biosynthèse de métabolites secondaires, la biosynthèse d'antibiotiques et la biosynthèse des purines. Aucune voie cellulaire commune sous-exprimée en biofilm n'a été trouvée par notre approche. Des trois voies cellulaires identifiées, la biosynthèse *de novo* de l'IMP semble être l'adaptation cellulaire la plus prometteuse pour servir de cible anti-biofilm. L'inactivation de gènes dans cette

voie, particulièrement *purL* et *purH*, altérerait significativement la formation du biofilm chez *S. aureus*.

2.1.2. Originalité du travail

Les biofilms bactériens sont couramment impliqués dans les infections nosocomiales et peuvent causer d'importantes infections chroniques s'ils ne sont pas traités correctement. Les stratégies anti-biofilm actuelles reposent majoritairement sur l'utilisation d'antibiotiques, mais ceux-ci possèdent une efficacité limitée due aux facteurs de résistance intrinsèques du biofilm face à ceux-ci. Le remodelage des voies métaboliques semble jouer un rôle central lors de la formation du biofilm, mais il n'est pas encore connu si ces adaptations cellulaires sont communes à travers les bactéries à Gram positif. Si oui, elles pourraient être ciblées pour développement de nouvelles stratégies anti-biofilm qui étendraient le spectre d'hôte, limiteraient l'évolution de résistance et amélioreraient l'efficacité des drogues actuelles. Notre étude vise à identifier des régulations communes intraespèces et interespèces lors de la formation du biofilm de *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis* en utilisant une approche transcriptomique. Nous avons donc utilisé différents milieux inducteurs du biofilm afin que notre étude soit indépendante de l'influence de l'environnement. De plus, deux souches par espèce bactérienne ont été employées pour identifier ces régulations centrales indépendamment du génome accessoire : USA300 et SH1000 pour *S. aureus*, ainsi que V583 et ATCC 29212 pour *E. faecalis*. Dans ces conditions, nous avons remarqué que la voie de biosynthèse *de novo* de l'IMP était systématiquement régulée chez toutes les souches de l'étude en biofilm. Cette voie métabolique pourrait donc devenir une cible anti-biofilm intéressante. Également, nos résultats de transcriptomique pourraient mettre en lumière de nouveau gène impliqué dans la physiologie du biofilm de *S. aureus* ou *E. faecalis*.

2.1.3. Contribution des auteurs

Martin Gélinas, étudiant 2^e cycle : J'ai participé à l'élaboration du projet qui a mené à cet article, la production de la majorité des résultats, de leurs analyses, ainsi qu'à l'écriture du manuscrit.

Léa Museau, étudiante 2^e cycle : Léa a contribué à la production de quelques résultats, tels que l'effet des milieux sur le patron d'expression des gènes. Également, elle a révisé le manuscrit avant la soumission.

Arielle Milot, étudiante 1^{er} cycle : Sous ma supervision lors d'un stage, Arielle a contribué à la production de quelques résultats, tel que les essais biofilm avec les souches mutantes et la conception de la carte métabolique de la voie des purines avec les valeurs d'expression des gènes.

Pr Pascale B. Beauregard : Pascale a été la principale investigatrice du projet et a donc contribué à l'élaboration du projet qui a mené à cet article, ainsi qu'à l'écriture du manuscrit.

2.1.4. Référence de l'article

Gélinas M, Museau L, Milot A, Beauregard PB. 2020. Characterization of the cellular adaptation during biofilm formation in Gram-positive bacteria. mBio: submitted manuscript.

2.2. Manuscrit soumis de l'article scientifique

Characterization of the cellular adaptation during biofilm formation in Gram-positive bacteria

Martin Gélinas^a, Léa Museau^a, Arielle Milot^a, Pascale B. Beauregard^{a#}

^aUniversité de Sherbrooke, Département de Biologie, Faculté des Sciences,
Sherbrooke, Québec, Canada, J1K 2R1

Running Head: Biofilm formation characterization of Gram+ strains

2.2.1. Abstract

Bacterial biofilms, involved in chronic infections, confer 100 to 1000 times more resistance to antibiotics, leading to treatment failure and complications. In comparison with their planktonic counterpart, some Gram-positive bacteria in biofilms seem to have modulated differently their central carbon metabolism, primary biosynthesis pathways and production of secondary metabolites. This adaptation of central metabolism might play a crucial role in biofilm formation by Gram-positive bacteria such as *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*, which are important causes of implant infections. Here, we used a transcriptomic approach to identify common cellular pathways modulated during biofilm formation in these bacteria. Different biofilm-inducing media and strains were used to identify core regulation that would be independent of the environment or accessory genome. The gene set enrichment analysis of the transcriptome of four different strains of Gram-positive bacteria identified biosynthesis of secondary metabolites, biosynthesis of antibiotics and purine biosynthesis as three commonly upregulated pathways in biofilm. No common downregulated pathways during biofilm formation between *S. aureus* and *E. faecalis* were identified with our approach. Of the three upregulated pathways, the *de novo* IMP biosynthesis pathway seems to be a promising target of cellular adaption during biofilm formation. Gene deletions in this pathway, particularly *purL* and *purH*, impaired significantly biofilm formation of *S. aureus*.

2.2.2. Importance

Biofilms are often involved in nosocomial infections and can cause serious chronic infections if not treated properly. Current anti-biofilm strategies rely on antibiotic usage, but these have a limited impact because of the biofilm's intrinsic resistance to drugs. Metabolism remodelling seems to play a central role during biofilm formation, but it is still unclear if those cellular adaptations are common in Gram-positive pathogens. If these pathways are widespread, they could be targets for new anti-biofilm strategies that increase the host spectrum, drug efficiency and prevent resistance evolution. Our project aims at identifying intra-species and inter-species common regulations during biofilm formation of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* using transcriptomic. We identified that a specific metabolic pathway, the *de novo* IMP biosynthesis, was systematically upregulated during biofilm formation. This pathway could constitute an interesting anti-biofilm target. Also, our results will be relevant for investigators interested in both species' biofilm physiology.

2.2.3. Introduction

Biofilm is the predominant prokaryotic lifeform on Earth, as approximately 80% of the bacteria adopt this lifestyle (Flemming and Wuerz, 2019). In biofilms, bacterial multicellular communities adhere to a surface or an interface and are embedded in a matrix of extracellular polymeric substances (EPS) (Donlan, 2002; Flemming et al., 2016). The intrinsic properties of the matrix confer them the ability to adapt to their environment and resist hostile conditions (Flemming et al., 2016). They are known to cause significant problems in different environments of human activity, such as the food industry, the industrial sector and the clinical sector (Costerton et al., 1987; Galié et al., 2018; Høiby et al., 2011; Sahoo et al., 2015).

According to the National Institutes of Health (NIH), up to 65% of nosocomial microbial infections and 80% of chronic infections involve bacterial biofilm (Jamal et al., 2018). In hospitals, patients with biomedical implants such as prostheses are particularly at risk of developing severe complications related to biofilm-mediated infection during or after their operation. These complications increase the morbidity and mortality rates of patients, as well as the duration and costs of hospitalization (Van Epps and Younger, 2016; Lewis, 2001). The most common pathogens isolated from those types of infection are *Staphylococcus aureus*, followed by *Enterococcus* spp., in approximately 36% and 19% of cases respectively (Arciola et al., 2018; Public Health Agency of Canada, 2014). Their ability to form biofilm provides 10 to 1000 times more resistance to antibiotics than the minimal inhibitory concentration (MIC) required to kill their planktonic counterparts (Davies, 2003), due to several intrinsic biofilm factors (Høiby et al., 2010b; Khatoon et al., 2018; Lebeaux et al., 2014; Lewis, 2001). Therefore, biomedical implant infections caused by biofilm can be particularly difficult to treat because they are often unresponsive to antibiotic lock therapy (ALT), the currently recommended clinical practice to prevent and treat catheter-related infections (Justo and Bookstaver, 2014).

S. aureus is a Gram-positive bacterium that naturally colonizes up to 60% of the population, but which can also become an opportunistic pathogen, causing a wide range of infections acquired in hospital or community environment (Kluytmans et al., 1997). *S. aureus* can form biofilms in which matrix is mainly composed of the polysaccharide intracellular adhesin (PIA), an important component for cell-cell adhesion (Mack et al., 2004). PIA production is regulated by the *icaADBC* operon (Beenken et al., 2004) and can be induced by adding a high concentration of glucose and salt in the medium (Cue et al., 2012; Fitzpatrick et al., 2005). However, while most *S. aureus* possess the *ica* operon, some of them produce a PIA-independent biofilm (Fitzpatrick et al., 2005). In these biofilms, the matrix is mostly

composed of eDNA and large proteins that form fibrils for intercellular adhesion (Otto, 2013). *S. aureus* resistant to methicillin (SARM) and *S. aureus* susceptible to methicillin (SASM) are more likely to produce PIA-independent and PIA-dependant biofilm, respectively (McCarthy et al., 2015; O’Gara, 2007). Although *S. aureus* biofilms are well studied, certain properties of PIA-dependant and PIA-independent biofilms are still debated (Mlynek et al., 2020).

E. faecalis is a Gram-positive bacteria primarily found as a commensal organism that colonizes in low abundance our gastrointestinal tract (Willett et al., 2019). In hospitals, *E. faecalis* can become an opportunistic pathogen causing several potentially lethal infections in susceptible patients (Edmond et al., 1996). *E. faecalis* possesses a high level of tolerance towards environmental stress and antibiotic treatments (Fisher and Phillips, 2009; Flahaut et al., 1996; Huycke et al., 1998; Wang et al., 2010), probably due to its ability to form a biofilm (Yin et al., 2019). *E. faecalis* biofilm matrix is mostly composed of eDNA, polysaccharides, lipoteichoic acid and extracellular proteases (Ch’ng et al., 2019), but the underlying mechanisms leading to its formation are still being investigated.

Recent studies revealed a vast remodelling of metabolic pathways during the early phase of biofilm formation in *Bacillus subtilis* and *B. cereus*, including modulation in fermentation processes, energy production, primary and secondary metabolism pathways (fatty acid, carbon, amino acid and nucleotides metabolism for example). Some of those pathways were not known to be related to biofilm formation before (Caro-Astorga et al., 2020; Pisithkul et al., 2019). In *S. aureus* or *E. faecalis*, some observations suggest that during biofilm formation, metabolic pathways such as the Krebs cycle (Zhu et al., 2009), secondary metabolites productions (Moormeier and Bayles, 2017) and respiration (Tendolkar et al., 2006; Zhu et al., 2007b) are positively or negatively regulated. Understanding the cellular adaptation that bacteria undergo during biofilm formation could help identify therapeutic strategies

to target many biofilms involved in various chronic infections, to improve the effectiveness of current drugs and limit the development of resistance.

Here, we used a transcriptomic approach to examine if the regulation of common cellular pathways during biofilm formation could be identified in *S. aureus* and *E. faecalis*. Depending on the strains, between 242 and 466 differentially expressed genes (DEGs) emerged from our analysis. Our gene set enrichment analysis (GSEA) revealed that biosynthesis of secondary metabolites, biosynthesis of antibiotics and purine biosynthesis are three commonly upregulated metabolic pathways in biofilm. Of note, there was no common downregulated pathway between *S. aureus* and *E. faecalis* during biofilm formation. Purine biosynthesis and in particular the *de novo* IMP biosynthesis pathway were the most enriched cellular function that arose from our analysis. Gene disruption in the *de novo* IMP biosynthesis pathway revealed its essentiality for robust biofilm growth. Furthermore, disruption of *purL* and *purH* had the most significant decrease in biofilm production than any other genes investigated.

2.2.4. Results

2.2.4.1. Determination of the growth condition for biofilm harvest.

Staphylococcus aureus and *Enterococcus faecalis* produce biofilms that can differ in their compositions on a variety of surfaces, in a natural environment or *in vitro* (Ch'ng et al., 2019; Moormeier and Bayles, 2017). To determine cellular pathways modulation common to biofilms that are not strain-dependent, we analyzed *S. aureus* USA300, an MRSA, and *S. aureus* SH1000, an MSSA, which produce PIA-independent and PIA-dependant biofilm respectively (Fitzpatrick et al., 2005; Moormeier et al., 2014). Differences in biofilm formation of *E. faecalis* strains are not known, so we used two widely used reference strains: *E. faecalis* V583 and

E. faecalis ATCC 29212. A core genome analysis between the chromosome of these two strains, using PATRIC Proteome Comparison Service (Wattam et al., 2016), revealed that *E. faecalis* strains share an average of 95.4% of protein sequence identity between their CDS and 1082 conserved genes with 100% of sequence identity. *S. aureus* strains share an average of 98.8% of sequence identity and 2250 conserved genes with 100% of sequence identity (see Fig. S1A and Table S6). Since *S. aureus* strains share a greater identity between their genes than *E. faecalis*, while producing very distinct biofilm, we can expect to find differences in biofilm growth regulation between *E. faecalis* strains. Interspecies comparisons show that *S. aureus* strains and *E. faecalis* strains have an average of 43.3% of sequence identity between their CDS and (see Fig. S1A and Table S6). The 459 genes with at least 50% homology between the four strains of this study are involved in different metabolisms, such as amino acid, carbon, fatty acid or nucleotide metabolism (Fig. S1B). This result gives insight into the metabolic pathways that could be conserved between the two species.

Since we wanted to harvest mRNA during the early stage of biofilm development, which coincides with the most pronounced biofilm cellular adaptations in other Gram-positive species (Caro-Astorga et al., 2020; Pisithkul et al., 2019), we followed biofilm growth by crystal violet. As shown in Fig. 2.1, biofilms of *S. aureus* and *E. faecalis* rapidly reach their stationary phase, which was around 9h for both *S. aureus* strains and 7h for both *E. faecalis* strains; RNA was harvested just before this plateau for both strains. In parallel planktonic growth was monitored by OD₆₀₀ with cultures in a different plate with agitation, in the same conditions, so our planktonic comparison would be done with RNA harvested at the same growth stage. Of note, at RNA collection time, BHlg (OD₅₉₀ = 0.725) seemed to induce a stronger biofilm formation than TSBg (OD₅₉₀ = 0.449) for *S. aureus* USA300.

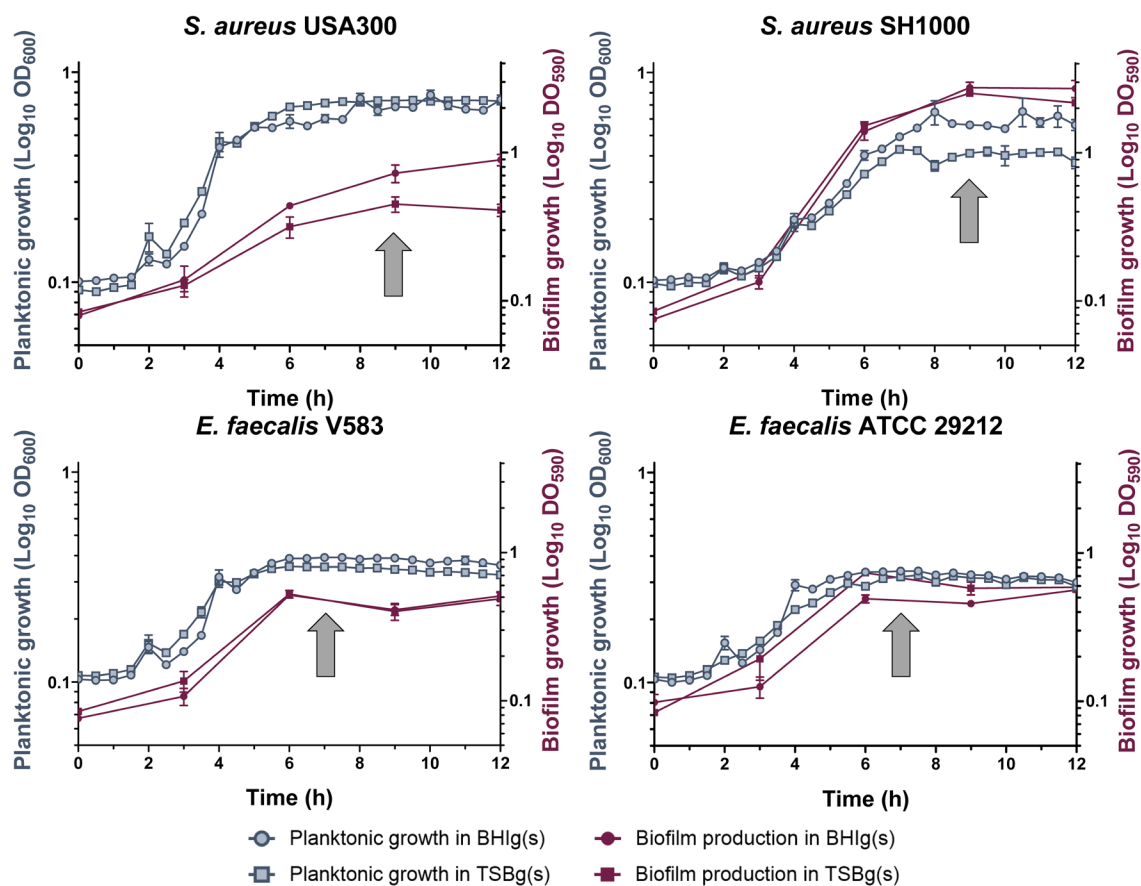


Figure 2.1 Growth dynamic of *S. aureus* and *E. faecalis* strains in a planktonic state or during biofilm formation. Planktonic growth (in blue) was performed at 37°C in shaking condition and measured by OD₆₀₀, while biofilm growth (in purple) was performed at 37°C without shaking and measured by crystal violet assay at OD₅₉₀. Growth was observed in either BHIg(s) (circle) or TSBg(s) (square), in both planktonic and biofilm growth conditions. Each point represents the mean of at least 3 biological replicates \pm standard deviation (SD). RNA harvesting time is indicated with a gray arrow.

2.2.4.2. Transcriptomic analysis reveals global changes in gene expression during biofilm formation.

We performed genome-wide analyses of changes in gene expression using transcriptome sequencing (RNA-seq) during *S. aureus* and *E. faecalis* biofilm formation, in BHlg(s) and TSBg(s). Biological triplicates of each condition were pooled together for the differential expression analysis, and according to the results of principal component analysis (PCA), they mostly cluster together (see Fig. S2). Genes were considered differentially expressed in biofilm versus planktonic when showing a statistical significance (adjusted *P*-value < 0.05) and a fold change (\log_2 ratio) $\geq |2.0|$. All media combined, 466 unique differentially expressed genes (DEGs; ~17.3% of the genome) were found for *S. aureus* USA300, 280 unique DEGs (~9.6% of the genome) for *S. aureus* SH1000, 242 unique DEGs (~7.7% of the genome) for *E. faecalis* V583 and 460 unique DEGs (~16.4% of the genome) for *E. faecalis* ATCC 29212 (Table S4). Upregulated (\log_2 fold change ≥ 2.0) and downregulated (\log_2 fold change ≤ -2.0) DEGs distribution among *S. aureus* and *E. faecalis* strains and media are displayed in the Volcano plots of Fig. 2.2.

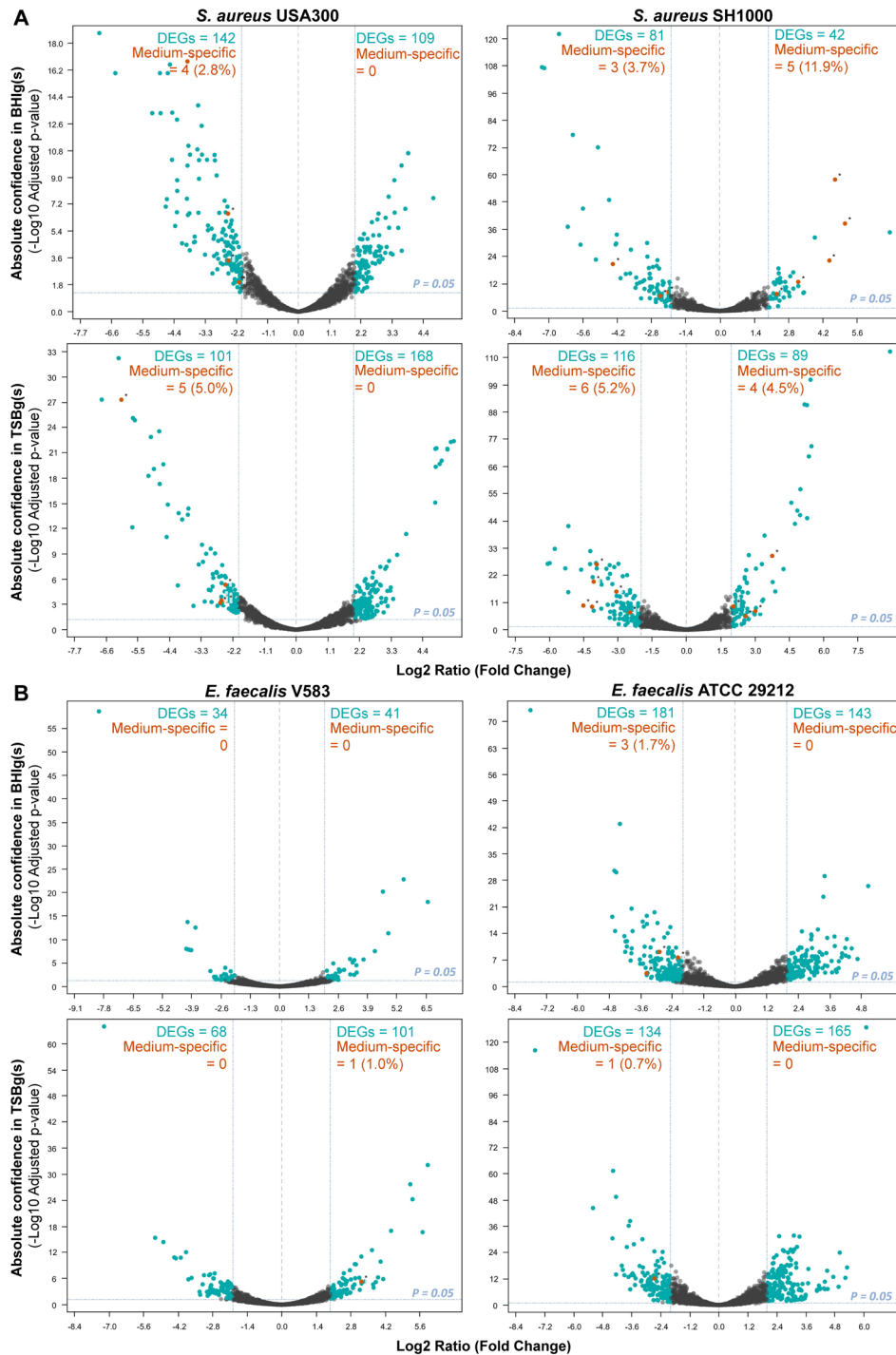


Figure 2.2 Transcriptional profiles of biofilm-grown cells and planktonic cells. The DEGs (blue dots) adjusted P -value cut-off was 0.05. Genes were

considered upregulated in biofilm if the log₂ ratio (fold change) was ≥ 2.0 and downregulated in biofilm if the fold change was ≤ -2.0 . DEGs from the media effect transcriptome analysis were then compared to the DEGs from the biofilm growth transcriptome analysis. Genes found in both analyses are represented in orange dots and represent possible DEGs influenced by media instead of biofilm formation. (A) *S. aureus* USA300 and *S. aureus* SH1000 DEGs in TSBg(s) or BHIg(s). (B) *E. faecalis* V583 and *S. aureus* 29212 DEGs in TSBg or BHIg.

2.2.4.3. Media effect on gene expression.

Metabolic pathways are shown to be involve in biofilm formation in other Gram-positive bacteria (Caro-Astorga et al., 2020; Pisithkul et al., 2019; Yan et al., 2017), but these pathways can be modulated by nutrients in the media. Thus, we examined the influence of two biofilm media on gene expression pattern, to determine if the pathway regulation we observed was specific to the media used, or to biofilm formation. Accordingly, we compared differential genes in BHIg(s) and TSBg(s), two widely used media to induce *S. aureus* and *E. faecalis* biofilm formation that are also known to potentially influence biofilm matrix composition (Mohamed and Huang, 2007; Sadovskaya et al., 2005; Sugimoto et al., 2018).

For *S. aureus* strains, 75 genes (~2.2% of the genome) of USA300 and 149 genes (~5.1% of the genome) of SH1000 were differentially expressed in one or the other media, all growth conditions combined. For *E. faecalis* strains, we noted only 11 genes (~0.4% of the genome) of V583 and 31 genes (~1.1% of the genome) of ATCC 29212 differentially expressed in one or the other media, all growth conditions combined (Table S5). The medium used had little to no effect on the gene expression pattern of *E. faecalis* strains during biofilm formation, with less than 1% of all DEGs being also differentially expressed in the medium transcriptome comparison. However, medium influence on gene expression was

slightly more pronounced for *S. aureus* strains: 9 of the 243 (3.7%) DEGs of USA300 planktonic cells were also found differentially expressed in BHIg or TSBg, while 8 of the 123 DEGs (6.5%) in TSBgs and 10 of the 205 (4.9%) DEGs in BHIgs of SH1000 planktonic and biofilm cells were also found differentially expressed in their respective medium (Fig. 2.2). Altogether, the biofilm-inducing medium seems to have a minor influence on the pattern of gene expression during biofilm formation and we proceed to a functional enrichment with the DEGs.

2.2.4.4. Gene set enrichment analysis (GSEA) reveals global cellular adaptations during biofilm formation.

Following the transcriptomic analysis during biofilm formation, we compared gene expression in biofilm vs planktonic of the four strains in TSBg(s) or BHIg(s) using DAVID Bioinformatic resources (Huang et al., 2009). Since *S. aureus* USA300 and *E. faecalis* ATCC 29212 locus tags were not recognized by DAVID, we attributed the corresponding recognized locus tag of their species counterpart based on sequence homology and orthologs with the help of BioCyc Pathway tools version 23.0 (Karp et al., 2015) and AureoWiki (Fuchs et al., 2018). Gene up- or downregulated in the heatmap of *S. aureus* and *E. faecalis* represent 497 and 316 GO:BP terms, respectively (Fig. 2.3A & B). Panel C of Fig. 2.3 enumerates the 20 most upregulated and downregulated GO:BP terms for each species, all strains and media combined. The same analysis was done with the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathways as the annotation source, which shows that 103 KEGG functions of *S. aureus* and the 97 KEGG functions of *E. faecalis* were represented in up- or down-regulated genes (Fig. S3). Many metabolism-related pathways were observed upregulated during biofilm formation, all annotation sources combined, such as carbon, fatty acid, nucleotides and some amino-acid metabolism.

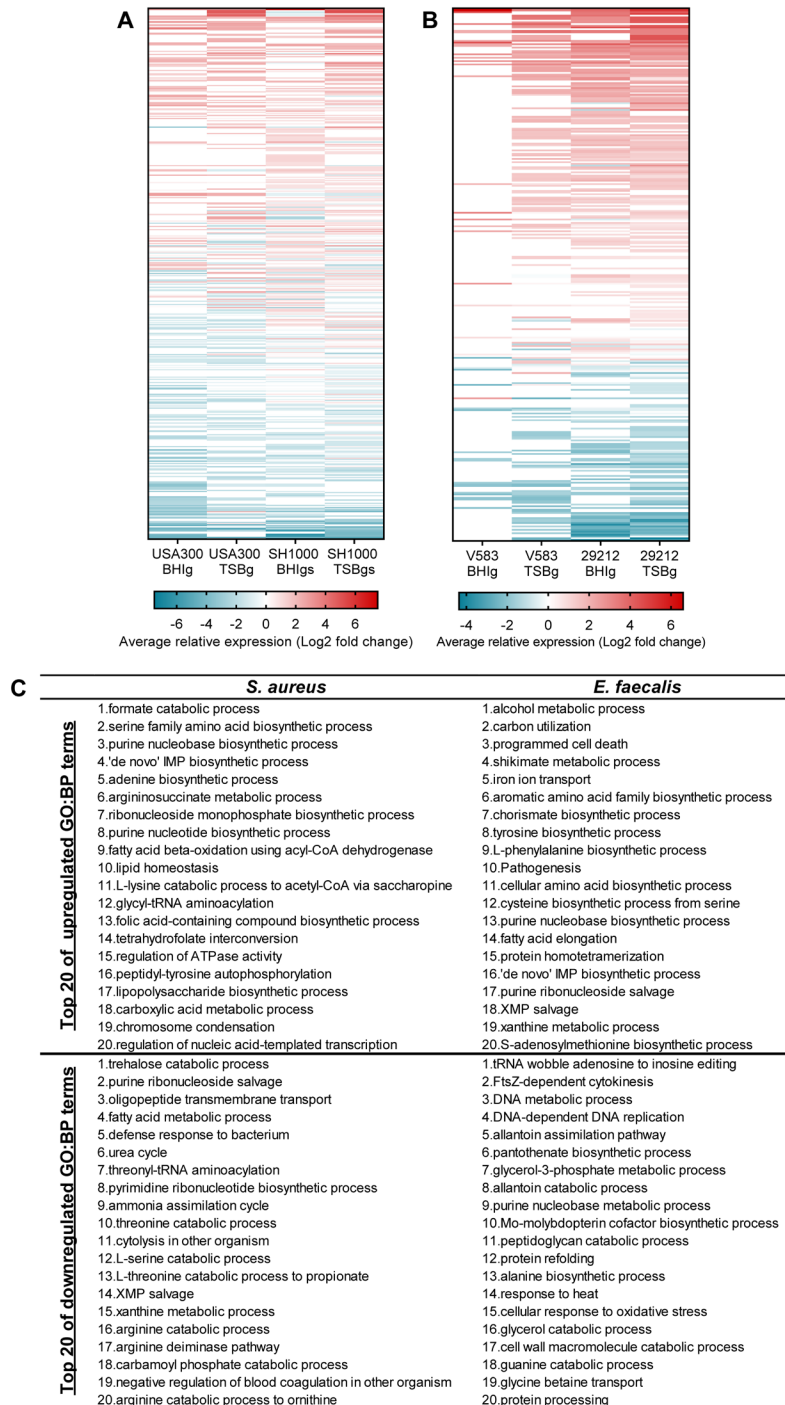


Figure 2.3 Average relative expression of GO:BP terms during biofilm formation. Each row of both heatmaps represents a single functional annotation

term from DAVID Bioinformatic software using GO:BP annotation source. A term's relative expression is the average of the log2 fold change of every associated gene with an adjusted P -value ≤ 0.05 from the transcriptomic analysis. The red (upregulated) and blue (downregulated) colour scale indicates relative expression level in average log2 fold change. (A) Functional annotation terms' (total = 497) relative expression in *S. aureus* USA300 and SH1000, in BHIg(s) or TSBg(s) medium. (B) Functional annotation terms' (total = 316) relative expression in *E. faecalis* V583 and 29212, in BHIg or TSBg medium. (C) Table of the top 20 upregulated and downregulated GO:BP terms for each species, by calculating the average of the relative expression of each term for the 2 strains in each medium.

2.2.4.5. Common cellular adaptations between *S. aureus* and *E. faecalis* strains during biofilm formation.

Next, we wanted to determine, in the cellular functions up- and downregulated during biofilm formation, which ones were common to all strains and media used. We attributed annotation with a GSEA using the DAVID Bioinformatics database, using GO:BP, KEGG pathways, Gene Ontology Molecular Function (GO:MF) and UniProt keywords (Up_Kw) as an annotation source to increase the range of finding potential functions. As shown in Fig. 2.4A, only eight terms from all annotation sources were commonly upregulated during biofilm formation. Interestingly, the 3 most enriched terms, with a fold enrichment value between 9.5 and 20, were related to purine biosynthesis. This result points toward a conserved implication of the purines biosynthesis pathway during biofilm formation in *S. aureus* et *E. faecalis*. Other cellular pathways identified as commonly upregulated in biofilms were the biosynthesis of antibiotics and the biosynthesis of secondary metabolites. However, the core genome analysis of the four strains shows that specific genes involved in these pathways are not conserved between *S. aureus* and *E. faecalis* (Fig. S1B). Our analysis did not highlight commonly

downregulated terms during biofilm formation. As depicted in Fig. 2.4B, although purines biosynthesis was upregulated in biofilm between *S. aureus* strains, pyrimidine biosynthesis and *de novo* UMP biosynthetic process were downregulated. Between *E. faecalis* strains, only the phosphotransferase system (PTS) has been identified commonly downregulated in biofilm.

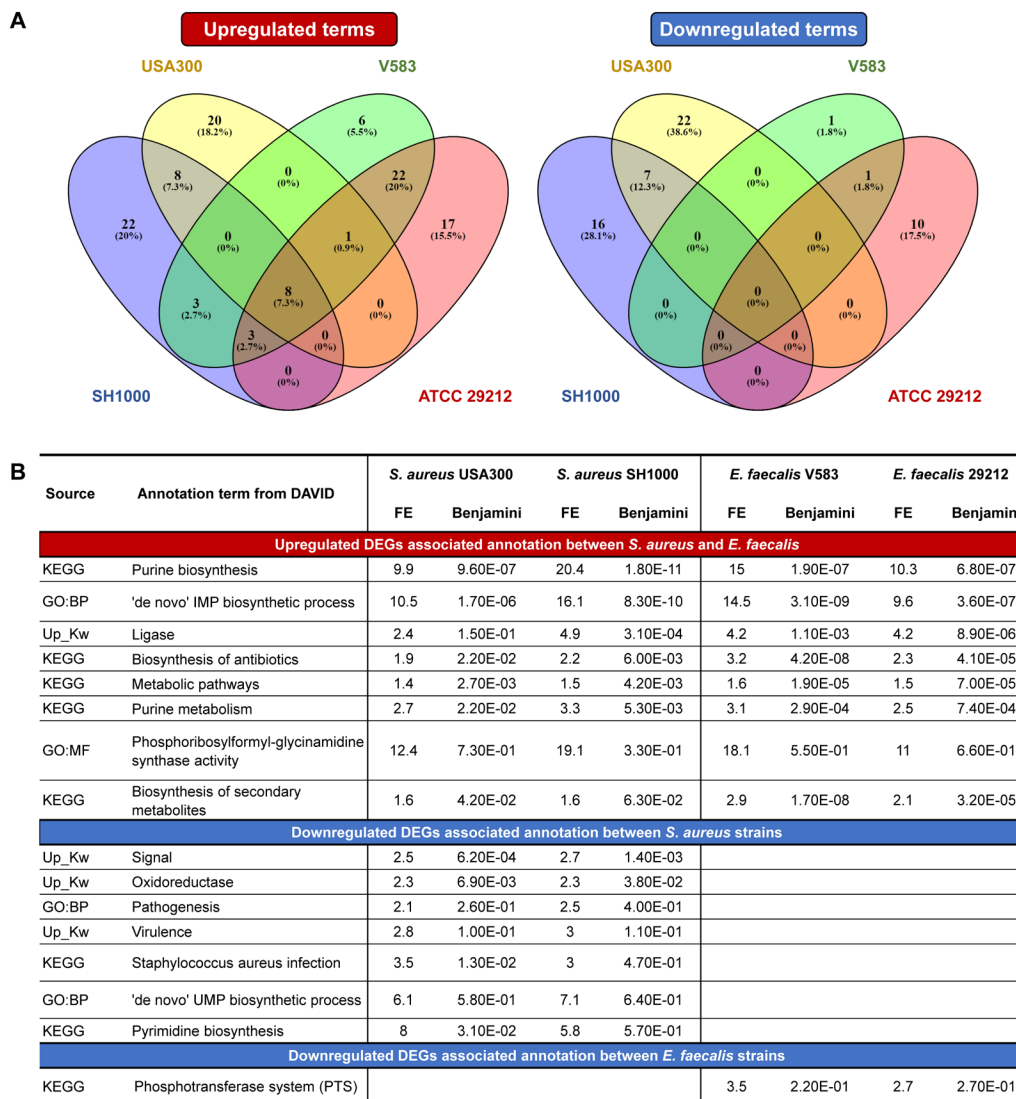


Figure 2.4 Common cellular adaptation between *S. aureus* and *E. faecalis* strains. (A) Venn diagram representation of the unique and common functional

terms of the upregulated DEGs (P -value ≤ 0.05 , log2 fold change ≥ 2.0) and downregulated DEGs (P -value ≤ 0.05 , log2 fold change ≤ -2.0) between *S. aureus* USA300 (yellow), *S. aureus* SH1000 (blue), *E. faecalis* V583 (green) and *E. faecalis* 29212 (red). (B) Table of the common cellular pathways between the four strains of this study, either upregulated or downregulated. GSEA was performed with DAVID Bioinformatic resources using KEGG pathways, GO:BP, GO:MF and Up_keywords annotation source. Pathways with a fold enrichment (FE) superior to 1.5 are considered interesting pathways while confidence in the enrichment is indicated by the Benjamini value.

To eliminate bias or omission that could be due to usage of a single GSEA tool, we submitted the same DEGs to ShinyGO v0.61 (Ge et al., 2020) and confirmed that purine biosynthesis was strongly regulated in biofilm cells (Fig. S4).

2.2.4.6. Purine biosynthesis remodelling during biofilm formation.

Bacteria can metabolize purines *de novo* from 5'-phosphoribosylamine-1-pyrophosphate (PRPP) by going through biosynthesis of inosine monophosphate (IMP), or they can recycle them from the nucleic acids of their environment via the purine salvage pathway (Kilstrup et al., 2005) (see Fig. 2.5). Genes involved in each reaction are indicated next to the arrow and their expression level (log2 fold change), all media combined, is depicted in adjacent boxes. Overall, genes in the *de novo* pathway were strongly upregulated (log2 fold change ≥ 2.0), homogeneously between all *S. aureus* and *E. faecalis* strains, except for *purB* (the only gene found also in the salvage pathway). On the opposite, genes of the biosynthesis and salvage pathways were only weakly and heterogeneously regulated.

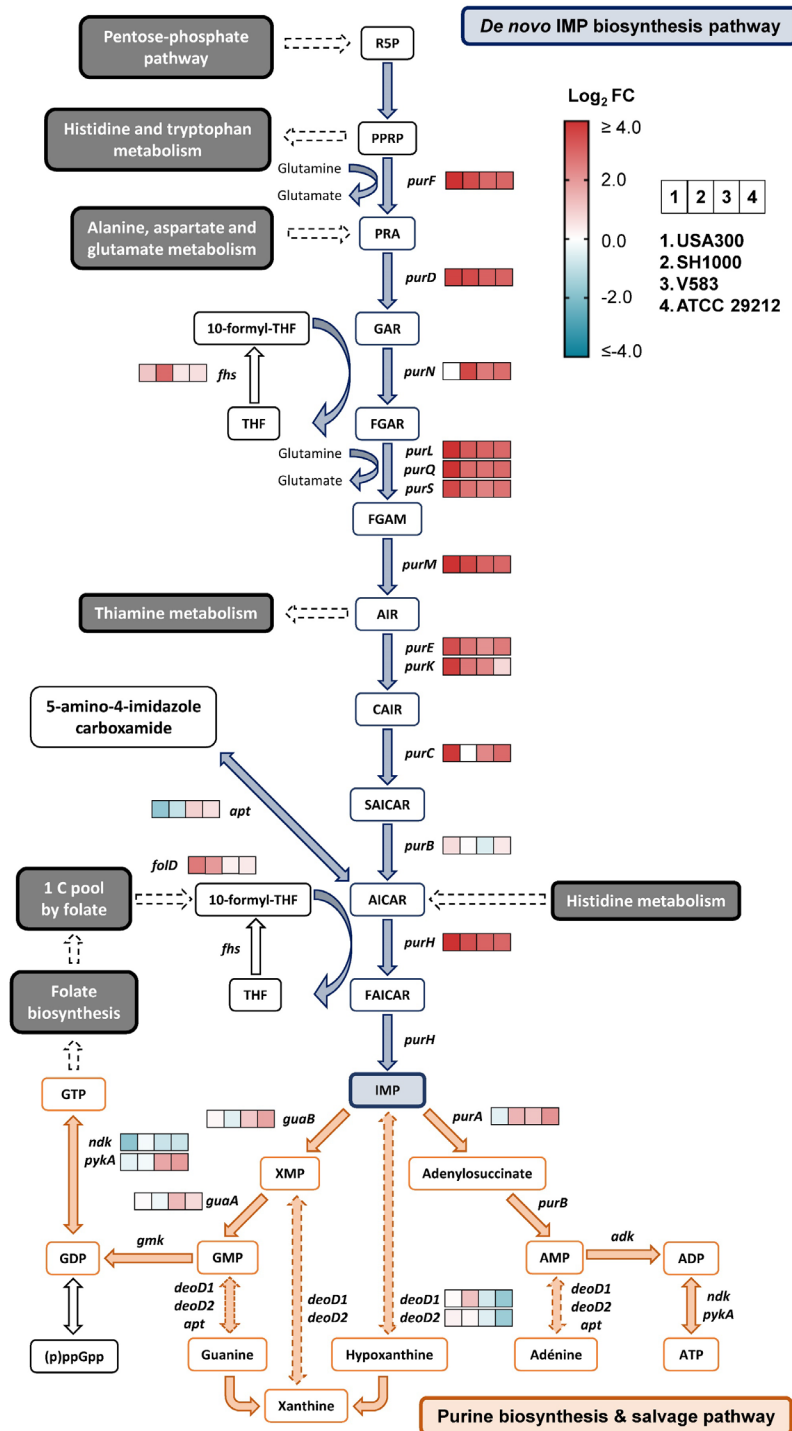


Figure 2.5 The *de novo* IMP biosynthesis pathway is strongly upregulated during biofilm formation. The purine biosynthesis pathway includes the *de novo*

IMP biosynthesis pathway (in blue) and the purine salvage pathway (in orange). Plain arrows indicate a unique reaction while dotted arrows indicate multiple reactions. The expression level (log2 fold change) during biofilm formation of the genes involved in the pathway (all media combined), as obtained by the transcriptomic analysis, are indicated by a 4-square stripe (from left to right: *S. aureus* USA300, *S. aureus* SH1000, *E. faecalis* V583 and *E. faecalis* 29212). The red and blue colour scale indicates high and low expression level, respectively. The *de novo* IMP biosynthesis pathway was strongly upregulated among the 4 strains of this study, compared to the salvage pathway. For abbreviations, see Table S3.

2.2.4.7. Genes involved in the *de novo* IMP biosynthesis pathway are important for biofilm production.

Since IMP biosynthesis was found highly upregulated in biofilm for all the strains of this study, we wanted to confirm that this pathway is important for biofilm production. Thus, we performed biofilm growth assays using *S. aureus* USA300 strains from the Nebraska Transposon Mutant Library (NTML) (Bose et al., 2013). Strains used contain insertions in *purF*, *purD*, *purL*, *purK* and *purH* from the *de novo* biosynthesis pathway, *purA* mutant from the purine biosynthesis and salvage pathway, *purB* mutant from both pathways and a *folD* mutant from the 1 C pool by folate pathway. The bifunctional protein FolD synthesized 10-formyl tetrahydrofolate (10-formyl-THF), a cofactor used by *purN* and *purH* during *de novo* IMP biosynthesis (Zhang et al., 2008). As demonstrated in Fig. 2.6A, disruption of genes involved in the *de novo* pathway significantly impaired biofilm production, while interrupting genes of the biosynthesis and salvage pathway did not affect (*purA*) or only slightly impaired (*purB*) biofilm production. Inactivation of genes involved in the latest step of IMP showed more defects in biofilm production, with *purL* and *purH* having the most significant impact. Importantly, the effects

observed on biofilm production by purine biosynthesis mutants were not due to a delayed or decreased cell division rate. As seen in Fig. 2.6A & B, no *S. aureus* mutants for the *de novo* IMP biosynthesis pathway showed a delay or reduction of cell division. Only *purA* and *purB* mutants showed a significant decrease in planktonic growth during the late exponential phase of growth (~ 9h), but their biofilm production was only lightly affected.

The reduction of more than a third in the biofilm production with some mutants for the *de novo* pathway of IMP biosynthesis, compared to the WT, seems to indicate that the purine pathway is required to form a robust biofilm. Further investigation could help support and characterize purine importance in Gram-positive biofilm formation.

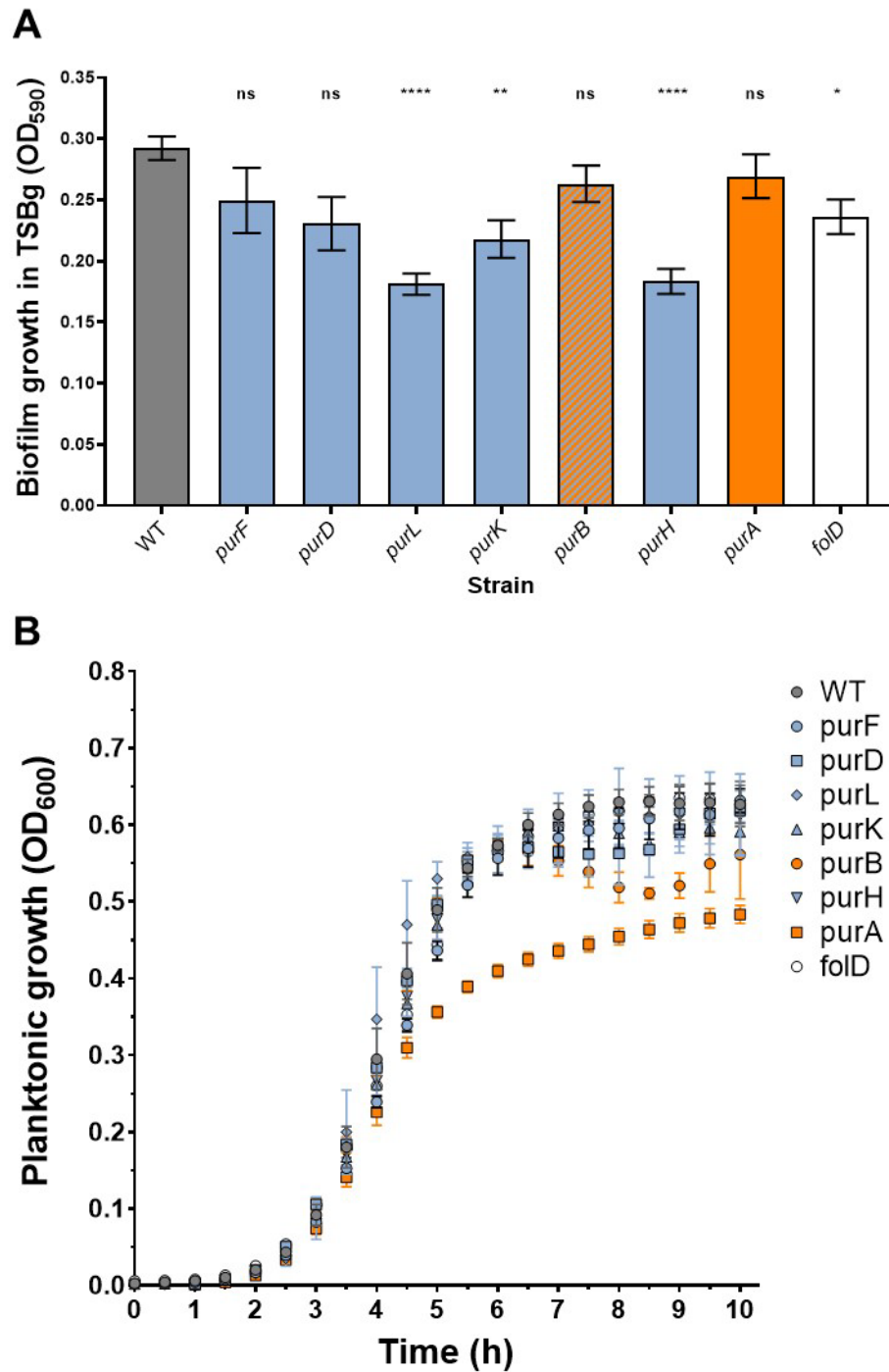


Figure 2.6 Gene disruption effect on biofilm production. (A) *S. aureus* USA300 mutants from the NTML for the purine biosynthesis pathway were subject to biofilm

quantification by the crystal violet assay. Each bar represents biofilm production (in OD₅₉₀) of at least 3 biological replicates \pm SEM in TSBg. Genes closer to the final step of the IMP biosynthesis pathway have a much impaired biofilm production compared to WT, while genes in the purine biosynthesis or purine salvage pathway have less or no effect on biofilm formation (one-way ANOVA; ns, not significant; *, P -value < 0.05; **, P -value < 0.01; ***, P -value < 0.001; ****, P -value < 0.0001). (B) Planktonic growth of *S. aureus* USA300 mutants from the NTML in TSBg validates biofilm phenotypes. Each point of the curve represents the cell density (OD₆₀₀) of at least 3 biological replicates \pm SEM. Mutants for the *de novo* IMP biosynthesis pathway have no growth defect compare to WT, while *purA* (t-test; ****, P -value < 0.0001) and *purB* mutants (t-test; **, P -value < 0.01) from the purine biosynthesis and purine salvage pathway have impaired growth compare to WT.

2.2.5. Materials and Methods

2.2.5.1. Strains and media

Strains used for the transcriptomic analysis are *S. aureus* USA300, *S. aureus* SH1000, *E. faecalis* V583 and *E. faecalis* ATCC 29212 (a kind gift from F. Malouin, Université de Sherbrooke). Biofilm phenotypic assays were performed with *S. aureus* USA300 mutants from the Nebraska Transposon Mutant Library (NTML) (Bose et al., 2013) (see Table S1 in the supplementary material). Strains were maintained on Tryptic Soy agar (TSA) or Brain Heart Infusion (BHI) agar plates, and for the NTML mutants, 5 μ g/ml erythromycin was added to the media. To induced biofilm formation, Tryptic Soy broth or BHI broth supplemented with 0.5% (wt/vol) glucose (TSBg or BHIg) was used for *E. faecalis* strains and *S. aureus* USA300, and TSBg or BHIg supplemented with 3.0% (wt/vol) sodium chloride (TSBgs or BHIgs) was used for *S. aureus* SH1000.

2.2.5.2. Growth measurement (planktonic cells and biofilm)

Colonies from overnight growth on TSA or BHI agar plates at 37°C were suspended in 1 ml of the appropriate biofilm inducing medium. Then, 200 µl of biofilm inducing medium was added in wells of a 48-wells culture plate and inoculated to an OD₆₀₀ of 0.005 with the bacteria suspension. For planktonic growth measurement (at least 3 biological replicates), plates were incubated in a Synergy™ HT plate reader (BioTek, Winooski, VT, USA) at 37°C with fast and continuous agitation to prevent biofilm formation and read at 600 nm every 30 min for at least 18 hours.

For biofilm formation, plates were incubated at 37°C without agitation; quantification (at least 3 biological replicates) was performed using the crystal violet method (O'Toole, 2010). Briefly, biofilms were gently washed with phosphate-buffered saline (PBS), covered with 200 µl of 0.01% (wt/vol) crystal violet and incubated for 20 min at room temperature, protected from light. Each well was then gently washed with sterile distilled water to remove the excess of dye. Stained biofilms are solubilized in 200 µl of acetic acid 33% and quantified by spectrophotometry at 590 nm.

2.2.5.3. mRNA extraction and isolation

Planktonic cells (3 biological replicates) were washed with cold PBS and kept in RNA stabilization solution (25 mM sodium citrate, 10 mM EDTA, 47% ammonium sulphate, adjusted to pH 5.2) until all samples were harvested. Biofilms (3 biological replicates) were washed with cold PBS and then suspended in RNA stabilization solution by scraping the bottom of the well until enough cells were harvested. Planktonic and biofilms cells were then centrifuged, the supernatant discarded, and the pellet kept at -80°C until extraction.

Cells were suspended in 250 µl of fresh lysis buffer (45 mg/ml of lysozyme, 16 µl/ml of lysostaphin 5 mg/ml and 10 µl/ml of mutanolysin 5 U/µl in Tris-EDTA) and incubated for 1h at 37°C, while mixed by every 15 min. They were then transferred in O-Ring tubes with 25 to 50 mg of acid-washed beads and mixed with 3 volumes of TRI Reagent®, to be lysed mechanically with a FastPrep-24™ Classic (MP Biomedicals, Santa Anna, CA, USA) (speed of 4.5 m/sec, 2x 20s). Total RNA was extracted with the Direct-zol™ RNA Miniprep Plus kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) following the manufacturer's instruction, including the DNase I (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) treatment in the extraction column. RNA quantity and the integrity number (RIN) were evaluated with an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). To remove ribosomal RNA (rRNA), samples were treated using a Pan-Prokaryote riboPOOL™ kit (siTOOLS Biotech GmbH, Planegg, Germany) coupled with streptavidin magnetic beads (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). mRNA was eluted in 50 µl of nuclease-free water and then cleaned and concentrated using a Clean & Concentrator kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA). mRNA samples were kept at -20°C if used on the same day or frozen at -80°C for an ulterior utilization. Ribo-depletion success was assessed by verifying the diminution or disappearance of the 16s rRNA and 23s rRNA peaks with an Agilent 2100 Bioanalyzer, between a treated sample and a non-treated sample.

2.2.5.4. Construction of prokaryotic Illumina libraries

Libraries were prepared for RNA sequencing according to the instructions of the NEBNext® Ultra™ II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina® (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), with the following exception. RNA samples were fragmented 7 min instead of 15 min to produce fragments superior to 100 pb. Instead of the adaptors provided with the kit, we used TruSeq compatible YIGA adaptors (see Table S2 in the supplementary material). Nucleic acid purification

was performed using Mag-Bind® TotalPure NGS beads (Omega Bio-Tek Inc, Norcross, GA, USA) following the recommended ratio of the NEBNext® kit. Ligation products were subject to PCR amplification using a reverse primer containing a unique 8 bp index for each sample (see Table S2 in the supplementary material). The concentration of the libraries was measured using a Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and 1.13 ng of each sample were pool in 80 µl of nuclease-free water. Quantity and quality of the final mix were confirmed with an Agilent 2100 Bioanalyzer before submitting to a Nextseq500 High Output 75 bp sequencing.

2.2.5.5. RNA sequencing data analysis

Around 8,000,000 reads per library were obtain using an Illumina Nextseq system providing single-ended reads of 75 bp each. The data was analyzed using Geneious Prime 2020.0.3 (<https://www.geneious.com>). Fastq files were trimmed with the BBDuk plugin using the default parameters and eliminating reads shorter than 10 bp. Trimmed data were then aligned with Bowtie2 (Langmead and Salzberg, 2012) using an “end-to-end” alignment type, a “High Sensitivity / Medium” preset and using the “do not trim option”, against the following reference chromosomes: GenBank accession number GCA_000013425.1 (for *S. aureus* SH1000, a close descended of the ancestral strain NCTC 8325 (Herbert et al., 2010)); GenBank accession number GCA_000017085.1 (for *S. aureus* USA300); GenBank accession number GCA_000742975.1 (for *E. faecalis* ATCC 29212) and GenBank accession number GCA_000007785.1 (for *E. faecalis* V583). Finally, the differentially expressed genes (DEGs) were assed with DESeq2 (Love et al., 2014) by combining the 3 biological replicates of each condition and comparing biofilm cultures vs planktonic cultures in either TSBg(s), BHIg(s) or both. Only the genes with an adjusted *P*-value ≤ 0.05 were retained for further analysis. DEGs were consider upregulated if they had a log2 fold change ≥ 2.0 and downregulated if

they had a log2 fold change ≤ -2.0 . For the transcriptomic study on media effect on genes expression, DEGs with a log2 fold change ≥ 2.0 are considered upregulated in BHIg(s) while DEGs with a log2 fold change ≤ 2.0 are considered upregulated in TSBg(s).

2.2.5.6. Functional annotation.

The various gene set enrichment analysis (GSEA) (or functional annotation) were performed using DAVID Bioinformatics Resources version 6.8 (Huang et al., 2009). The locus tag of the upregulated and downregulated DEGs were submitted as a list to DAVID and then analyzed with the Functional Annotation tool. The UP_KEYWORDS of the Functional_category, the KEGG_PATHWAY of the Pathways category, the GOTERM_BP_DIRECT and/or GOTERM_MF_DIRECT of the Gene_Ontology category were selected as possible annotation sources. The analysis was performed with the functional annotation chart, including the default thresholds of a count of 2 and an EASE of 0.1 and applying the following statistical test: Fold Enrichment (FE), Benjamini and FDR. Following DAVID recommendations, function with a fold enrichment ≥ 1.5 and a benjamini value < 0.05 were considered interesting. The GSEA comparing biofilm vs planktonic conditions was confirmed with the ShinyGO v0.61 software. The locus tags of the same DEGs were submitted as a list, using either the *E. faecalis* STRINGdb or the *S. aureus* NCTC8325 STRINGdb and the default *P*-value cut-off (FDR) of 0.05. Both KEGG pathways and Gene Ontology: biological process (GO:BP) were considered. To assess the common pathway between the 4 strains of this study, their list of all the enrichment terms from DAVID or ShinyGO was compared by the Venn diagram generator online tool Venny 2.1.0 (Olivieros, 2007).

2.2.5.7. Core genome circular comparison

To identify potential conserved cellular pathways among the strain of this study, each of them was submitted to the Proteome Comparison Service performs, a protein sequence-based genome comparison tool from PATRIC (Wattam et al., 2016), using the default parameters and the following reference genomes: *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* NCTC 8325 (Genome ID: 93061.5), *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* USA300_TCH1516 (Genome ID: 451516.9), *Enterococcus faecalis* V583 (Genome ID: 226185.9) and *E. faecalis* ATCC 29212 (Genome ID: 1201292.8). Genome comparison was illustrated in a scalable vector graphic (SVG) image file produced by Circos. All the recognized locus tags of the genes sharing over 50% of sequence identity in the genome comparison text file of every strain were subject to a GSEA as described earlier.

2.2.5.8. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 8.4.0. Comparisons were done using Student's t-test or one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple-comparison test, both with 95% confidence intervals.

2.2.6. Discussion

Regulatory mechanisms leading to biofilm formation are often species or even strain-specific, making it difficult to develop anti-biofilm strategies that target a wide spectrum of bacteria (Floyd et al., 2017; Malheiro and Simões, 2016). Recent developments in biofilm research highlighted a wide metabolic remodelling during biofilm formation in some Gram-positive bacteria (Caro-Astorga et al., 2020; Pisithkul et al., 2019). Using a transcriptomic approach with Gram-positive strains

of clinical importance, we indeed observed a widespread remodelling of several metabolic pathways in biofilms (Fig. 2.3).

TSB and BHI medium supplemented with glucose and/or sodium chloride are two frequently use media to induce biofilm formation of *S. aureus* and *E. faecalis* (Sugimoto et al., 2018; Tendolkar et al., 2004). However, TSB was suggested to promote PIA production for *S. aureus* while BHI would promote a protein-based matrix (Sadovskaya et al., 2005). According to our transcriptomic results, several genes were found differentially expressed in one or the other medium, all strains and growth conditions combined. Many of those DEGs were attributed to primary metabolism pathways and some to secondary metabolism pathways (Table S5). Media influence on the transcriptome profiling of *E. faecalis* strains during biofilm formation was mostly not significant. However, several DEGs during biofilm formation of *S. aureus* strains could have been due to environmental factors (Fig. 2.2). Different growth media were reported to influence biofilm phenotypic properties and matrix composition in other Gram-positive strains such as *B. subtilis* (Dogsa et al., 2013). Therefore, we cannot ignore that the medium could influence gene expression during planktonic and/or biofilm growth of some *S. aureus* strains, and biofilm-inducing media should be chosen carefully accordingly.

When comparing the functional enrichment of the DEGs during biofilm formation of *S. aureus* USA300 and SH1000 to *E. faecalis* V583 and ATCC 29212, only three biological functions were found commonly upregulated during biofilm growth: biosynthesis of secondary metabolites, biosynthesis of antibiotics and purine biosynthesis (Fig. 2.4). Some of the genes and biological functions we found upregulated in *S. aureus* during biofilm growth (Fig. 2.3) were already observed in other transcriptomic, metabolomic and/or proteomic studies using other *S. aureus* strains. For exemple, genes involved in several amino acids uptake and metabolism (i.e.: arginine, glutamine, serine and threonine), fermentative

processes, nucleotide metabolism and the TCA cycle are commonly reported being differentially regulated in biofilm with variable intensity (Ammons et al., 2014; Liu et al., 2018; Resch et al., 2005, 2006; Stipetic et al., 2016). These observations weren't investigated further, perhaps because only the strongest regulated pathways involved in specific *in vivo* biofilm formation conditions or biofilm responses to specific environmental stresses were discussed. Furthermore, such studies are less common in *E. faecalis* strains and only a few reported metabolic adaptation during biofilm formation (Seneviratne et al., 2017; Suryaetha et al., 2019). Therefore, our data provide new pieces of knowledge on the biofilm formation of *E. faecalis* that could be exploited in further studies and consolidate past observations on *S. aureus* biofilm formation.

Several studies previously reported purine biosynthesis as being upregulated in Gram-positive bacteria and even some Gram-negative bacteria during biofilm formation (Ge et al., 2008; Kim et al., 2014; Philips et al., 2017; Pisithkul et al., 2019; Shaffer et al., 2017; Yan et al., 2017; Yoshioka and Newell, 2016). Similar to the finding of these studies, we found a strong upregulation of the *de novo* IMP biosynthetic process during biofilm formation in *E. faecalis* and *S. aureus* strains (Fig. 2.5). Gene disruption in this pathway, but not in the purine salvage and biosynthesis pathway, leads to a decrease in *S. aureus* USA300 biofilm production (Fig. 2.6). While it is not the strongest metabolism pathway upregulated in *S. aureus* and *E. faecalis* strains, which could perhaps explain why this pathway was never further studied, it is one of the only pathways that are consistently upregulated among bacteria. Despite many observations of purines involvement and importance during biofilm formation, the biological role of purines or IMP in this process is still unclear.

Purines are required for eDNA production, an important constituent of the extracellular matrix of *S. aureus* (Dengler et al., 2015), *E. faecalis* (Thomas et al.,

2008) and other Gram-positive bacteria such as *B. subtilis* or *B. cereus* (Vilain et al., 2009). However, a study demonstrated that in *B. cereus*, *purD* and *purH* deletion did not affect significantly the level of eDNA in *B. cereus* matrix compare to the WT strain (Yan et al., 2017). Guanosine monophosphate (GMP) and adenosine monophosphate can lead to the production of cyclic-di-GMP and cyclic-di-AMP respectively, two molecules that are involved in biofilm formation in several Gram-positive bacteria (Fahmi et al., 2019). GMP can also form guanosine pentophosphate (ppGpp) from GDP, which play a role in the biofilm formation of *E. faecalis* (Chávez de Paz et al., 2012). Limiting nucleotides or IMP precursors in a biofilm-inducing medium could help better understand purine implication in the biofilm composition. Drugs targeting different steps of the purine biosynthesis pathway could also be employed to investigate this phenomenon in other Gram-positive strains that lack efficient transformation tools or an available mutant library.

Altogether, observations and reports from other studies corroborate the results in this study and support our claim that the remodelling of certain core metabolism pathways could be prevalent among many Gram-positive bacteria during biofilm formation. Our results suggest that purine biosynthesis could be a potent metabolic pathway leading to biofilm formation in a wide spectrum of Gram-positive bacteria and further studies help to exploit this pathway to develop new anti-biofilm therapies.

2.2.7. Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

2.2.8. References

- Ali, L., Goraya, M.U., Arafat, Y., Ajmal, M., Chen, J.L., and Yu, D. (2017). Molecular mechanism of quorum-sensing in *Enterococcus faecalis*: Its role in virulence and therapeutic approaches. *Int. J. Mol. Sci.* **18**.
- Allon, M. (2007). Current management of vascular access. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **2**, 786–800.
- Amato, S.M., Fazen, C.H., Henry, T.C., Mok, W.W.K., Orman, M.A., Sandvik, E.L., Volzing, K.G., and Brynildsen, M.P. (2014). The role of metabolism in bacterial persistence. *Front. Microbiol.* **5**.
- Ammons, M.C.B., Tripet, B.P., Carlson, R.P., Kirker, K.R., Gross, M.A., Stanisich, J.J., and Copi??, V. (2014). Quantitative NMR metabolite profiling of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* discriminates between biofilm and planktonic phenotypes. *J. Proteome Res.* **13**, 2973–2985.
- Arciola, C.R., Campoccia, D., and Montanaro, L. (2018). Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion. *Nat. Rev. Microbiol.* **16**, 397–409.
- Beenken, K.E., Dunman, P.M., McAleese, F., Macapagal, D., Murphy, E., Projan, S.J., Blevins, J.S., and Smeltzer, M.S. (2004). Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J. Bacteriol.* **186**, 4665–4684.
- Beloin, C., Renard, S., Ghigo, J.M., and Lebeaux, D. (2014). Novel approaches to combat bacterial biofilms. *Curr. Opin. Pharmacol.* **18**, 61–68.
- Biswas, R., Voggu, L., Simon, U.K., Hentschel, P., Thumm, G., and GÄ¶tz, F. (2006). Activity of the major staphylococcal autolysin Atl. *FEMS Microbiol. Lett.* **259**, 260–268.
- Bose, J.L., Fey, P.D., and Bayles, K.W. (2013). Genetic tools to enhance the study of gene function and regulation in *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 2218–2224.
- Caro-Astorga, J., Frenzel, E., Perkins, J.R., Álvarez-Mena, A., de Vicente, A., Ranea, J.A.G., Kuipers, O.P., and Romero, D. (2020). Biofilm formation displays intrinsic offensive and defensive features of *Bacillus cereus*. *Npj Biofilms Microbiomes* **6**.
- Ch'ng, J.H., Chong, K.K.L., Lam, L.N., Wong, J.J., and Kline, K.A. (2019). Biofilm-associated infection by enterococci. *Nat. Rev. Microbiol.* **17**, 82–94.
- Chávez de Paz, L.E., Lemos, J.A., Wickström, C., and Sedgley, C.M. (2012). Role of (p)ppGpp in biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 1627–1630.

Chen, Y., Yan, F., Chai, Y., Liu, H., Kolter, R., Losick, R., and Guo, J. (2013). Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation. *Environ. Microbiol.* *15*, 848–864.

Corrigan, R.M., Bellows, L.E., Wood, A., and Gründling, A. (2016). PpGpp negatively impacts ribosome assembly affecting growth and antimicrobial tolerance in Gram positive bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *113*, E1710–E1719.

Costerton, J.W., Cheng, K.J., Geesey, G.G., Ladd, T.I., Nickel, J.C., Dasgupta, M., and Marrie, T.J. (1987). Bacterial Biofilms in Nature and Disease. *Annu. Rev. Microbiol.* *41*, 435–464.

Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, Í., and Penadés, J.R. (2001). Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J. Bacteriol.* *183*, 2888–2896.

Cue, D., Lei, M.G., and Lee, C.Y. (2012). Genetic regulation of the intercellular adhesion locus in staphylococci. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* *2*, 38.

D'Agata, E.M.C., Webb, G.F., Horn, M.A., Moellering, Jr., R.C., and Ruan, S. (2009). Modeling the Invasion of Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* into Hospitals. *Clin. Infect. Dis.* *48*, 274–284.

Dale, J.L., Nilson, J.L., Barnes, A.M.T., and Dunny, G.M. (2017). Restructuring of *Enterococcus faecalis* biofilm architecture in response to antibiotic-induced stress. *Npj Biofilms Microbiomes* *3*, 15.

Davies, D. (2003). Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat. Rev. Drug Discov.* *2*, 114–122.

Dengler, V., Foulston, L., DeFrancesco, A.S., and Losick, R. (2015). An electrostatic net model for the role of extracellular DNA in biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* *197*, 3779–3787.

Dieltjens, L., Appermans, K., Lissens, M., Lories, B., Kim, W., Van der Eycken, E. V., Foster, K.R., and Steenackers, H.P. (2020). Inhibiting bacterial cooperation is an evolutionarily robust anti-biofilm strategy. *Nat. Commun.* *11*, 107.

Dogsa, I., Brloznik, M., Stopar, D., and Mandic-Mulec, I. (2013). Exopolymer Diversity and the Role of Levan in *Bacillus subtilis* Biofilms. *PLoS One* *8*, e62044.

Donlan, R.M. (2002). Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* *8*, 881–890.

Doulgeraki, A.I., Di Ciccio, P., Ianieri, A., and Nychas, G.-J.E. (2017). Methicillin-resistant food-related *Staphylococcus aureus*: a review of current knowledge and biofilm formation for future studies and applications. *Res. Microbiol.* *168*, 1–15.

- Ebbole, D.J., and Zalkin, H. (1989). *Bacillus subtilis* pur operon expression and regulation. *J. Bacteriol.* **171**, 2136–2141.
- Edmond, M.B., Ober, J.F., Dawson, J.D., Weinbaum, D.L., and Wenzel, R.P. (1996). Vancomycin-Resistant Enterococcal Bacteremia: Natural History and Attributable Mortality. *Clin. Infect. Dis.* **23**, 1234–1239.
- Van Epps, J.S., and Younger, J.G. (2016). Implantable device-related infection. *Shock* **46**, 597–608.
- Fahmi, T., Faozia, S., Port, G.C., and Cho, K.H. (2019). The second messenger C-di-AMP regulates diverse cellular pathways involved in stress response, biofilm formation, cell wall homeostasis, speB expression, and virulence in *Streptococcus pyogenes*. *Infect. Immun.* **87**, 1–19.
- Fair, R.J., and Tor, Y. (2014). Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspect. Medicin. Chem.* **25**–64.
- Fisher, K., and Phillips, C. (2009). The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology* **155**, 1749–1757.
- Fitzpatrick, F., Humphreys, H., and O’Gara, J.P. (2005). Evidence for *icaADBC*-independent biofilm development mechanism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 1973–1976.
- Flahaut, S., Hartke, A., Giard, J., Benachour, A., Boutibonnes, P., and Auffray, Y. (1996). Relationship between stress response towards bile salts, acid and heat treatment in *Enterococcus faecalis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **138**, 49–54.
- Fleming, D., and Rumbaugh, K. (2018). The Consequences of Biofilm Dispersal on the Host. *Sci. Rep.* **8**.
- Flemming, H.C., and Wuertz, S. (2019). Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* **17**, 247–260.
- Flemming, H.C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S.A., and Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**, 563–575.
- Floyd, K.A., Eberly, A.R., and Hadjifrangiskou, M. (2017). Adhesion of bacteria to surfaces and biofilm formation on medical devices. In *Biofilms and Implantable Medical Devices: Infection and Control*, (Elsevier Inc.), pp. 47–95.
- Foulquié Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., and De Vuyst, L. (2006). The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food Microbiol.* **106**, 1–24.
- Frank, K.L., Guiton, P.S., Barnes, A.M.T., Manias, D.A., Chuang-Smith, O.N., Kohler, P.L., Spaulding, A.R., Hultgren, S.J., Schlievert, P.M., and Dunny, G.M.

(2013). AhrC and Eep are biofilm infection-associated virulence factors in *Enterococcus faecalis*. *Infect. Immun.* **81**, 1696–1708.

Frank, K.L., Vergidis, P., Brinkman, C.L., Greenwood Quaintance, K.E., Barnes, A.M.T., Mandrekar, J.N., Schlievert, P.M., Dunny, G.M., and Patel, R. (2015). Evaluation of the *Enterococcus faecalis* biofilm-associated virulence factors AhrC and Eep in rat foreign body osteomyelitis and in vitro biofilm-associated antimicrobial resistance. *PLoS One* **10**, e0130187.

Fuchs, S., Mehlan, H., Bernhardt, J., Hennig, A., Michalik, S., Surmann, K., Pané-Farré, J., Giese, A., Weiss, S., Backert, L., et al. (2018). AureoWiki-The repository of the *Staphylococcus aureus* research and annotation community. *Int. J. Med. Microbiol.* **308**, 558–568.

Galié, S., García-Gutiérrez, C., Miguélez, E.M., Villar, C.J., and Lombó, F. (2018). Biofilms in the food industry: Health aspects and control methods. *Front. Microbiol.* **9**.

Garrett, T.R., Bhakoo, M., and Zhang, Z. (2008). Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Prog. Nat. Sci.* **18**, 1049–1056.

Ge, S.X., Jung, D., Jung, D., and Yao, R. (2020). ShinyGO: A graphical gene-set enrichment tool for animals and plants. *Bioinformatics* **36**, 2628–2629.

Ge, X., Kitten, T., Chen, Z., Lee, S.P., Munro, C.L., and Xu, P. (2008). Identification of *Streptococcus sanguinis* genes required for biofilm formation and examination of their role in endocarditis virulence. *Infect. Immun.* **76**, 2551–2559.

Gil, R., Silva, F.J., Pereto, J., and Moya, A. (2004). Determination of the Core of a Minimal Bacterial Gene Set. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 518–537.

Gross, M., Cramton, S.E., Götz, F., and Peschel, A. (2001). Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. *Infect. Immun.* **69**, 3423–3426.

Hancock, L.E., and Perego, M. (2004). The *Enterococcus faecalis* fsr two-component system controls biofilm development through production of gelatinase. *J. Bacteriol.* **186**, 5629–5639.

Henry-Stanley, M.J., Shepherd, M.M., Wells, C.L., and Hess, D.J. (2011). Role of *Staphylococcus aureus* protein A in adherence to silastic catheters. *J. Surg. Res.* **167**, 9–13.

Herbert, S., Ziebandt, A.K., Ohlsen, K., Schäfer, T., Hecker, M., Albrecht, D., Novick, R., and Götz, F. (2010). Repair of global regulators in *Staphylococcus aureus* 8325 and comparative analysis with other clinical isolates. *Infect. Immun.* **78**, 2877–2889.

Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., and Ciofu, O. (2010a). Antibiotic

resistance of bacterial biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents* 35, 322–332.

Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., and Ciofu, O. (2010b). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents* 35, 322–332.

Høiby, N., Ciofu, O., Johansen, H.K., Song, Z.J., Moser, C., Jensen, P.Ø., Molin, S., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T., and Bjarnsholt, T. (2011). The clinical impact of bacterial biofilms. In *International Journal of Oral Science*, pp. 55–65.

Hook, A.L., Chang, C.Y., Yang, J., Lockett, J., Cockayne, A., Atkinson, S., Mei, Y., Bayston, R., Irvine, D.J., Langer, R., et al. (2012). Combinatorial discovery of polymers resistant to bacterial attachment. *Nat. Biotechnol.* 30, 868–875.

Huang, D.W., Sherman, B.T., and Lempicki, R.A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* 4, 44–57.

Hufnagel, M., Koch, S., Creti, R., Baldassarri, L., and Huebner, J. (2004). A Putative Sugar-Binding Transcriptional Regulator in a Novel Gene Locus in *Enterococcus faecalis* Contributes to Production of Biofilm and Prolonged Bacteremia in Mice. *J. Infect. Dis.* 189, 420–430.

Huycke, M.M., Sahm, D.F., and Gilmore, M.S. (1998). Multiple-drug resistant enterococci: The nature of the problem and an agenda for the future. *Emerg. Infect. Dis.* 4, 239–249.

Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M.A., Hussain, T., Ali, M., Rafiq, M., and Kamil, M.A. (2018). Bacterial biofilm and associated infections. *J. Chinese Med. Assoc.* 81.

Jefferson, K.K., Cramton, S.E., Götz, F., and Pier, G.B. (2003). Identification of a 5-nucleotide sequence that controls expression of the *ica* locus in *Staphylococcus aureus* and characterization of the DNA-binding properties of IcaR. *Mol. Microbiol.* 48, 889–899.

Jolivet-Gougeon, A., and Bonnaure-Mallet, M. (2014). Biofilms as a mechanism of bacterial resistance. *Drug Discov. Today Technol.* 11, 49–56.

Justo, J.A., and Bookstaver, P.B. (2014). Antibiotic lock therapy: Review of technique and logistical challenges. *Infect. Drug Resist.* 7, 343–363.

Kaplan, J.B. (2010). Biofilm Dispersal: Mechanisms, Clinical Implications, and Potential Therapeutic Uses. *J. Dent. Res.* 89, 205–218.

Karp, P.D., Paley, S.M., Midford, P.E., Krummenacker, M., Billington, R., Kothari, A., Ong, W.K., Subhraveti, P., Keseler, I.M., and Caspi, R. (2015). Pathway Tools version 23.0: Integrated Software for Pathway/Genome Informatics and Systems Biology. *Brief. Bioinform.* 11, 40–79.

- Khatoon, Z., McTiernan, C.D., Suuronen, E.J., Mah, T.F., and Alarcon, E.I. (2018). Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. *Heliyon* 4.
- Kilstrup, M., Hammer, K., Ruhdal Jensen, P., and Martinussen, J. (2005). Nucleotide metabolism and its control in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 555–590.
- Kim, J.K., Kwon, J.Y., Kim, S.K., Han, S.H., Won, Y.J., Lee, J.H., Kim, C.H., Fukatsu, T., and Lee, B.L. (2014). Purine biosynthesis, biofilm formation, and persistence of an insect-microbe gut symbiosis. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 4374–4382.
- Kluytmans, J., Van Belkum, A., and Verbrugh, H. (1997). Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: Epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin. Microbiol. Rev.* 10, 505–520.
- Langmead, B., and Salzberg, S.L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* 9, 357–359.
- Lebeaux, D., Ghigo, J.-M., and Beloin, C. (2014). Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 78, 510–543.
- Lécuyer, F., Bourassa, J.-S., Gélinas, M., Charron-Lamoureux, V., Burrus, V., and Beauregard, P.B. (2018). Biofilm Formation Drives Transfer of the Conjugative Element ICEBs1 in *Bacillus subtilis*. *MSphere* 3, e00473-18.
- Lewis, K. (2001). Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 999–1007.
- Liu, J., Hou, Y., Peters, B.M., Su, J., Li, L., Li, B., Chen, D., Li, Y., Xu, Z., and Shirtliff, M.E. (2018). Transcriptomics study on *Staphylococcus aureus* biofilm under low concentration of ampicillin. *Front. Microbiol.* 9, 2413.
- Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15, 550.
- Mack, D., Fischer, W., Krokotsch, A., Leopold, K., Hartmann, R., Egge, H., and Laufs, R. (1996). The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear β -1,6-linked glucosaminoglycan: Purification and structural analysis. *J. Bacteriol.* 178, 175–183.
- Mack, D., Becker, P., Chatterjee, I., Dobinsky, S., Knobloch, J.K.M., Peters, G., Rohde, H., and Herrmann, M. (2004). Mechanisms of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*: Functional molecules, regulatory circuits, and adaptive responses. *Int. J. Med. Microbiol.* 294, 203–212.
- Madsen, J.S., Burmølle, M., Hansen, L.H., and Sørensen, S.J. (2012). The

interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **65**, 183–195.

Malheiro, J., and Simões, M. (2016). Antimicrobial resistance of biofilms in medical devices. In *Biofilms and Implantable Medical Devices: Infection and Control*, (Elsevier Inc.), pp. 98–113.

McCarthy, H., Rudkin, J.K., Black, N.S., Gallagher, L., O'Neill, E., and O'Gara, J.P. (2015). Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **5**, 1.

McDougal, L.K., Steward, C.D., Killgore, G.E., Chaitram, J.M., McAllister, S.K., and Tenover, F.C. (2003). Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 5113–5120.

Minogue, T.D., Daligault, H.E., Davenport, K.W., Broomall, S.M., Bruce, D.C., Chain, P.S., Coyne, S.R., Chertkov, O., Freitas, T., Gibbons, H.S., et al. (2014). Complete Genome Assembly of *Enterococcus faecalis* 29212, a Laboratory Reference Strain. *Genome Announc.* **2**.

Mlynek, K.D., Bullock, L.L., Stone, C.J., Curran, L.J., Marat, R., Bayles, K.W., and Brinsmade, S.R. (2020). Genetic and biochemical analysis of CodY-mediated cell aggregation in *Staphylococcus aureus* reveals an interaction between eDNA and polysaccharide in the extracellular matrix. *J. Bacteriol.*

Mohamed, J.A., and Huang, D.B. (2007). Biofilm formation by enterococci. *J. Med. Microbiol.* **56**, 1581–1588.

Moormeier, D.E., and Bayles, K.W. (2017). *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. *Mol. Microbiol.* **104**, 365–376.

Moormeier, D.E., Bose, J.L., Horswill, A.R., and Bayles, K.W. (2014). Temporal and stochastic control of *Staphylococcus aureus* biofilm development. *MBio* **5**.

Mulani, M.S., Kamble, E.E., Kumkar, S.N., Tawre, M.S., and Pardesi, K.R. (2019). Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: A review. *Front. Microbiol.* **10**.

Nimmo, G.R. (2012). USA300 abroad: global spread of a virulent strain of community- associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* **18**, 725–734.

O'Gara, J.P. (2007). *ica* and beyond: Biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **270**, 179–188.

O'Neill, A.J. (2010). *Staphylococcus aureus* SH1000 and 8325-4: comparative genome sequences of key laboratory strains in staphylococcal research. *Lett.*

Appl. Microbiol. 51, 358–361.

O'Neill, E., Pozzi, C., Houston, P., Smyth, D., Humphreys, H., Robinson, D.A., and O'Gara, J.P. (2007). Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from device-related infections. J. Clin. Microbiol. 45, 1379–1388.

O'Toole, G.A. (2010). Microtiter dish Biofilm formation assay. J. Vis. Exp.

Olivieros, J.C. (2007). VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams.

Otto, M. (2013). Staphylococcal Infections: Mechanisms of Biofilm Maturation and Detachment as Critical Determinants of Pathogenicity. Annu. Rev. Med. 64, 175–188.

Patti, J.M., Allen, B.L., McGavin, M.J., and Hook, M. (1994). MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. Annu. Rev. Microbiol. 48, 585–617.

Paulsen, I.T. (2003). Role of Mobile DNA in the Evolution of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis*. Science (80-.). 299, 2071–2074.

Pedley, A.M., and Benkovic, S.J. (2017). A New View into the Regulation of Purine Metabolism: The Purinosome. Trends Biochem. Sci. 42, 141–154.

Philips, J., Rabaey, K., Lovley, D.R., and Vargas, M. (2017). Biofilm formation by *Clostridium ljungdahlii* is induced by sodium chloride stress: Experimental evaluation and transcriptome analysis. PLoS One 12.

Pillai, S.K., Sakoulas, G., Eliopoulos, G.M., Moellering, Jr., R.C., Murray, B.E., and Inouye, R.T. (2004). Effects of Glucose on *fsr*- Mediated Biofilm Formation in *Enterococcus faecalis*. J. Infect. Dis. 190, 967–970.

Pisithkul, T., Schroeder, J.W., Trujillo, E.A., Yeesin, P., Stevenson, D.M., Chaikumar, T., Coon, J.J., Wang, J.D., and Amador-Noguez, D. (2019). Metabolic Remodeling during Biofilm Development of *Bacillus subtilis*. MBio 10, e00623-19.

Public Health Agency of Canada (2014). Central Venous Catheter-Associated Blood Stream Infections in Intensive Care Units in Canadian Acute-Care Hospitals - Surveillance Report (Centre for Communicable Diseases and Infection Control, Public Health Agency of Canada).

Resch, A., Rosenstein, R., Nerz, C., and Götz, F. (2005). Differential gene expression profiling of *Staphylococcus aureus* cultivated under biofilm and planktonic conditions. Appl. Environ. Microbiol. 71, 2663–2676.

Resch, A., Leicht, S., Saric, M., Pásztor, L., Jakob, A., Götz, F., and Nordheim, A. (2006). Comparative proteome analysis of *Staphylococcus aureus* biofilm and

planktonic cells and correlation with transcriptome profiling. *Proteomics* 6, 1867–1877.

Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Flahaut, S., Kogan, G., and Jabbouri, S. (2005). Extracellular carbohydrate-containing polymers of a model biofilm-producing strain, *Staphylococcus epidermidis* RP62A. *Infect. Immun.* 73, 3007–3017.

Sahm, D.F., Kissinger, J., Gilmore, M.S., Murray, P.R., Mulder, R., Solliday, J., and Clarke, B. (1989). In vitro susceptibility studies of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33, 1588–1591.

Sahoo, D., Bhatt, M., Jena, S., Dash, D., and Chayani, N. (2015). Study of biofilm in bacteria from water pipelines. *J. Clin. Diagnostic Res.* 9, 9–11.

Seidl, K., Goerke, C., Wolz, C., Mack, D., Berger-Bächi, B., and Bischoff, M. (2008). *Staphylococcus aureus* CcpA affects biofilm formation. *Infect. Immun.* 76, 2044–2050.

Seneviratne, C.J., Suriyanarayanan, T., Swarup, S., Chia, K.H.B., Nagarajan, N., and Zhang, C. (2017). Transcriptomics Analysis Reveals Putative Genes Involved in Biofilm Formation and Biofilm-associated Drug Resistance of *Enterococcus faecalis*. *J. Endod.* 43, 949–955.

Shaffer, C.L., Zhang, E.W., Dudley, A.G., Dixon, B.R.E.A., Guckes, K.R., Breland, E.J., Floyd, K.A., Casella, D.P., Algood, H.M.S., Clayton, D.B., et al. (2017). Purine biosynthesis metabolically constrains intracellular survival of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 85.

Shi, T., Wang, Y., Wang, Z., Wang, G., Liu, D., Fu, J., Chen, T., and Zhao, X. (2014). Deregulation of purine pathway in *Bacillus subtilis* and its use in riboflavin biosynthesis. *Microb. Cell Fact.* 13, 101.

Solano, C., Echeverez, M., and Lasa, I. (2014). Biofilm dispersion and quorum sensing. *Curr. Opin. Microbiol.* 18, 96–104.

Stipetic, L.H., Dalby, M.J., Davies, R.L., Morton, F.R., Ramage, G., and Burgess, K.E. V. (2016). A novel metabolomic approach used for the comparison of *Staphylococcus aureus* planktonic cells and biofilm samples. *Metabolomics* 12, 75.

Sugimoto, S., Sato, F., Miyakawa, R., Chiba, A., Onodera, S., Hori, S., and Mizunoe, Y. (2018). Broad impact of extracellular DNA on biofilm formation by clinically isolated Methicillin-resistant and -sensitive strains of *Staphylococcus aureus*. *Sci. Rep.* 8.

Suryaletha, K., Narendrakumar, L., John, J., Radhakrishnan, M.P., George, S., and Thomas, S. (2019). Decoding the proteomic changes involved in the biofilm formation of *Enterococcus faecalis* SK460 to elucidate potential biofilm determinants. *BMC Microbiol.* 19, 146.

Swenson, J.M., Clark, N.C., Sahm, D.F., Ferraro, M.J., Doern, G., Hindler, J., Jorgensen, J.H., Pfaller, M.A., Reller, † L Barth, Weinstein, M.P., et al. (1995). Molecular Characterization and Multilaboratory Evaluation of *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 for Quality Control of Screening Tests for Vancomycin and High-Level Aminoglycoside Resistance in Enterococci.

Switzer, R.L., Bond, R.W., Ruppen, M.E., and Rosenzweig, S. (1985). Involvement of the Stringent Response in Regulation of Protein Degradation in *Bacillus subtilis*. In Current Topics in Cellular Regulation, pp. 373–386.

Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D.L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., et al. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect. Dis.* 18, 318–327.

Tendolkar, P.M., Baghdayan, A.S., Gilmore, M.S., and Shankar, N. (2004). Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect. Immun.* 72, 6032–6039.

Tendolkar, P.M., Baghdayan, A.S., and Shankar, N. (2006). Putative surface proteins encoded within a novel transferable locus confer a high-biofilm phenotype to *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* 188, 2063–2072.

Tenover, F.C., and Goering, R. V (2009). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300: Origin and epidemiology. *J. Antimicrob. Chemother.* 64, 441–446.

Thomas, V.C., Thurlow, L.R., Boyle, D., and Hancock, L.E. (2008). Regulation of autolysis-dependent extracellular DNA release by *Enterococcus faecalis* extracellular proteases influences biofilm development. *J. Bacteriol.* 190, 5690–5698.

Thurlow, L.R., Joshi, G.S., Clark, J.R., Spontak, J.S., Neely, C.J., Maile, R., and Richardson, A.R. (2013). Functional modularity of the arginine catabolic mobile element contributes to the success of USA300 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Cell Host Microbe* 13, 100–107.

Toledo-Arana, A., Valle, J., Solano, C., Arrizubieta, M.J., Cucarella, C., Lamata, M., Amorena, B., Leiva, J., Penadés, J.R., and Lasa, I. (2001). The Enterococcal Surface Protein, Esp, Is Involved in *Enterococcus faecalis* Biofilm Formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4538–4545.

Turnbough, C.L., and Switzer, R.L. (1975). Oxygen-dependent inactivation of glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase in stationary-phase cultures of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 121, 108–114.

Turner, N.A., Sharma-Kuinkel, B.K., Maskarinec, S.A., Eichenberger, E.M., Shah, P.P., Carugati, M., Holland, T.L., and Fowler, V.G. (2019). Methicillin-resistant

Staphylococcus aureus: an overview of basic and clinical research. Nat. Rev. Microbiol. 17, 203–218.

Ulrich, M., Bastian, M., Cramton, S.E., Ziegler, K., Pragman, A.A., Bragonzi, A., Memmi, G., Wolz, C., Schlievert, P.M., Cheung, A., et al. (2007). The staphylococcal respiratory response regulator SrrAB induces ica gene transcription and polysaccharide intercellular adhesin expression, protecting *Staphylococcus aureus* from neutrophil killing under anaerobic growth conditions. Mol. Microbiol. 65, 1276–1287.

Ventola, C.L. (2015). The antibiotic resistance crisis: causes and threats. P T J. 40, 277–283.

Vilain, S., Pretorius, J.M., Theron, J., and Brözel, V.S. (2009). DNA as an adhesin: *Bacillus cereus* requires extracellular DNA to form biofilms. Appl. Environ. Microbiol. 75, 2861–2868.

Wang, M., Wei, H., Zhao, Y., Shang, L., Di, L., Lyu, C., and Liu, J. (2019). Analysis of multidrug-resistant bacteria in 3223 patients with hospital-acquired infections (HAI) from a tertiary general hospital in China. Bosn. J. Basic Med. Sci. 19, 86–93.

Wang, X., He, X., Jiang, Z., Wang, J., Chen, X., Liu, D., Wang, F., Guo, Y., Zhao, J., Liu, F., et al. (2010). Proteomic analysis of the *Enterococcus faecalis* V583 strain and clinical isolate V309 under vancomycin treatment. J. Proteome Res. 9, 1772–1785.

Wattam, A.R., Davis, J.J., Assaf, R., Boisvert, S., Brettin, T., Bun, C., Conrad, N., Dietrich, E.M., Disz, T., Gabbard, J.L., et al. (2016). Improvements to PATRIC, the all-bacterial Bioinformatics Database and Analysis Resource Center. Nucleic Acids Res. 45, 535–542.

Wertheim, H.F.L., Melles, D.C., Vos, M.C., Van Leeuwen, W., Van Belkum, A., Verbrugh, H.A., and Nouwen, J.L. (2005). The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. Lancet Infect. Dis. 5, 751–762.

Willett, J.L.E., Ji, M.M., and Dunny, G.M. (2019). Exploiting biofilm phenotypes for functional characterization of hypothetical genes in *Enterococcus faecalis*. NPJ Biofilms Microbiomes 5, 23.

Wong, J.Y., Bernlohr, D.A., Turnbough, C.L., and Switzer, R.L. (1981). Purification and properties of glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase from *Bacillus subtilis*. Biochemistry 20, 5669–5674.

World Health Organisation (2017). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics (World Health Organization).

Yan, F., Yu, Y., Gozzi, K., Chen, Y., Guo, J.H., and Chai, Y. (2017). Genome-wide investigation of biofilm formation in *Bacillus cereus*. Appl. Environ. Microbiol. 83.

- Yin, W., Wang, Y., Liu, L., and He, J. (2019). Biofilms: The microbial “protective clothing” in extreme environments. *Int. J. Mol. Sci.* 20.
- Yoshioka, S., and Newell, P.D. (2016). Disruption of de novo purine biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 leads to reduced biofilm formation and a reduction in cell size of surface-attached but not planktonic cells. *PeerJ* 2016.
- You, Y., Xue, T., Cao, L., Zhao, L., Sun, H., and Sun, B. (2014). *Staphylococcus aureus* glucose-induced biofilm accessory proteins, GbaAB, influence biofilm formation in a PIA-dependent manner. *Int. J. Med. Microbiol.* 304, 603–612.
- Zhang, Y., Morar, M., and Ealick, S.E. (2008). Structural biology of the purine biosynthetic pathway. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 3699–3724.
- Zheng, J.X., Bai, B., Lin, Z.W., Pu, Z.Y., Yao, W.M., Chen, Z., Li, D.Y., Deng, X. Bin, Deng, Q.W., and Yu, Z.J. (2018). Characterization of biofilm formation by *Enterococcus faecalis* isolates derived from urinary tract infections in China. *J. Med. Microbiol.* 67, 60–67.
- Zhu, Y., Weiss, E.C., Otto, M., Fey, P.D., Smeltzer, M.S., and Somerville, G.A. (2007a). *Staphylococcus aureus* biofilm metabolism and the influence of arginine on polysaccharide intercellular adhesin synthesis, biofilm formation, and pathogenesis. *Infect. Immun.* 75, 4219–4226.
- Zhu, Y., Weiss, E.C., Otto, M., Fey, P.D., Smeltzer, M.S., and Somerville, G.A. (2007b). *Staphylococcus aureus* biofilm metabolism and the influence of arginine on polysaccharide intercellular adhesin synthesis, biofilm formation, and pathogenesis. *Infect. Immun.* 75, 4219–4226.
- Zhu, Y., Xiong, Y.Q., Sadykov, M.R., Fey, P.D., Lei, M.G., Lee, C.Y., Bayer, A.S., and Somerville, G.A. (2009). Tricarboxylic acid cycle-dependent attenuation of *Staphylococcus aureus* in vivo virulence by selective inhibition of amino acid transport. *Infect. Immun.* 77, 4256–4264.

2.2.9. Acknowledgments

We thank F. Malouin and J.-P. Côté for their kind gift of strains, L.-C. Fortier and S. Rodrigue for critical reading of the manuscript, and members of the Beauregard, Burrus, Malouin and Rodrigue lab for helpful discussions. This work was supported by a Canada Graduate Scholarships (Master’s Program) from the Natural Sciences and Engineering Council of Canada (NSERC) to M.G.

2.2.10. Supplementary material

Table S1. Strains used in this study.

Organisme	Strain name	Genotype	Provenance
<i>E. faecalis</i>	V583	Wild type	Lab stock ¹
<i>E. faecalis</i>	ATCC 29212	Wild type	Lab stock ¹
<i>S. aureus</i>	USA300	Wild type	Lab stock ¹
<i>S. aureus</i>	SH1000	Wild type	Lab stock ¹
<i>S. aureus</i>	NE191	USA300 <i>folD</i>	NTML ²
<i>S. aureus</i>	NE353	USA300 <i>purH</i>	NTML ²
<i>S. aureus</i>	NE522	USA300 <i>purB</i>	NTML ²
<i>S. aureus</i>	NE529	USA300 <i>purA</i>	NTML ²
<i>S. aureus</i>	NE581	USA300 <i>purF</i>	NTML ²
<i>S. aureus</i>	NE744	USA300 <i>purK</i>	NTML ²
<i>S. aureus</i>	NE750	USA300 <i>purD</i>	NTML ²
<i>S. aureus</i>	NE1464	USA300 <i>purL</i>	NTML ²

¹ These strains come from the Malouin lab stock.

² These strains come from the Côté lab stock. Reference: Bose JL, Fey PD, Bayles KW. 2013. Genetic tools to enhance the study of gene function and regulation in *Staphylococcus aureus*. Appl Environ Microbiol 79:2218–2224.

Table S2. Prokaryotic Illumina libraries primers.

Primers name	Sequence (5' – 3')	Usage
TruSeq-Mlpt-YIGA-bot	/5Phos/GAT CGG AAG AGC ACA CGT CT	Adaptor
YIGA-top	ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TC*T	Adaptor
I-GA-PE-F primer	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC TAGATCGC ACACTCTTCCCTACACGACGCT	PCR amplification
I-Tru-Index-R01	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT ATTGGTCA GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC	PCR amplification
I-Tru-Index-R02	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT TAAAAATG GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC	PCR amplification
I-Tru-Index-R03	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT ATCACTGT GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC	PCR amplification
I-Tru-Index-R04	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT TATTTTAC GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC	PCR amplification
I-Tru-Index-R05	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT ATATTGGC GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC	PCR amplification
I-Tru-Index-R06	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT TATACAAG GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC	PCR amplification
I-Tru-Index-R07	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT ATGATCTG GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC	PCR amplification
I-Tru-Index-R08	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT TACTCTAC GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC	PCR amplification
I-Tru-Index-R09	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT ATAAGCTA GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC	PCR amplification
I-Tru-Index-R10	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT TAGTATAG GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC	PCR amplification
I-Tru-Index-R11	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT ATTACAAG GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC	PCR amplification
I-Tru-Index-R12	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT TAATTGGC GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC	PCR amplification
I-Tru-Index-R13	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT ATCTCTAC GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC	PCR amplification
I-Tru-Index-R14	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT TAGATCTG GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC	PCR amplification
I-Tru-Index-R15	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT ATGCGGAC GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC	PCR amplification
I-Tru-Index-R16	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT TAATCAGT GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC	PCR amplification
I-Tru-Index-R17	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT ATTTTAC GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC	PCR amplification
I-Tru-Index-R18	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT TCACTGT GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC	PCR amplification
I-Tru-Index-R19	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT ATGGCCAC GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC	PCR amplification
I-Tru-Index-R20	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT TACCGGTG GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC	PCR amplification

Table S2. Suite

Primers name	Sequence (5' – 3')	Usage
I-Tru-Index-R21	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT ATCGAAAC GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC	PCR amplification
I-Tru-Index-R22	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT TATAGTTG GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC	PCR amplification
I-Tru-Index-R23	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT ATCGTACG GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC	PCR amplification
I-Tru-Index-R24	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT TAGAATGA GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC	PCR amplification
I-Tru-Index-R25	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT ATGCTACC GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC	PCR amplification
I-Tru-Index-R26	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT TAATCGTG GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC	PCR amplification
I-Tru-Index-R27	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT ATATCAGT GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC	PCR amplification
I-Tru-Index-R28	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT TAGCGGAC GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC	PCR amplification
I-Tru-Index-R29	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT ATGCTCAT GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC	PCR amplification
I-Tru-Index-R30	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT TACGATTA GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC	PCR amplification
I-Tru-Index-R31	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT ATAGGAAT GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC	PCR amplification
I-Tru-Index-R32	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT ATTAGTTG GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC	PCR amplification
I-Tru-Index-R33	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT TACGAAAC GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC	PCR amplification
I-Tru-Index-R34	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT ATCCGGTG GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC	PCR amplification
I-Tru-Index-R35	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT TAGGCCAC GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC	PCR amplification
I-Tru-Index-R36	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT ATATCGTG GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC	PCR amplification
I-Tru-Index-R37	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT TAGCTACC GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC	PCR amplification
I-Tru-Index-R38	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT ATCGCCTG GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC	PCR amplification
I-Tru-Index-R39	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT ATAAATG GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC	PCR amplification
I-Tru-Index-R40	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT TATGGTCA GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC	PCR amplification
I-Tru-Index-R41	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT ATATTCCG GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC	PCR amplification
I-Tru-Index-R42	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT ATGTATAG GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC	PCR amplification
I-Tru-Index-R43	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT TAAAGCTA GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC	PCR amplification

Table S2. Suite

Primers name	Sequence (5' – 3')	Usage
I-Tru-Index-R44	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT ATCGATTA GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC	PCR amplification
I-Tru-Index-R45	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT TAGCTCAT GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC	PCR amplification
I-Tru-Index-R46	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT ATGAATGA GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC	PCR amplification
I-Tru-Index-R47	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT TACGTACG GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC	PCR amplification
I-Tru-Index-R48	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT ATCGTGAT GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC	PCR amplification

Table S3. Abbreviation used in the purine biosynthesis pathway.

Abbreviation	Nomenclature
(p)ppGpp	guanosine pentophosphate
ADP	adenosine diphosphate
AICAR	5'-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide
AIR	5'-aminoimidazole ribotide
AMP	adenosine monophosphate
ATP	adenosine triphosphate
CAIR	5'-phosphoribosyl-4-carboxy-5-aminoimidazol
FAICAR	5'-formamidoimidazole-4-carboxamide ribotide
FGAM	5'-phosphoribosylformylglycinamidine
FGAR	5'-phosphoribosyl-N-formylglycineamid
GAR	glycineamide ribonucleotide
GDP	guanosine diphosphate
GMP	guanosine monophosphate
GTP	guanosine triphosphate
IMP	inosine-5-phosphate
PRA	5'-phosphoribosylamine
PRPP	5'-phosphoribosylamine-1-pyrophosphate
R5P	ribose-5-phosphate
SAICAR	phosphoribosylaminoimidazolesuccinocarboxamide
XMP	xanthosine monophosphate

Table S4. Differential expression analysis and functional annotation of *S. aureus* and *E. faecalis* strain during biofilm formation.



Table S4.
Differential expressi

Table S5. DEGs from the media influence transcriptomic analysis.



Table S5. DEGs
from the media influ

Table S6. Core genome analysis of *S. aureus* and *E. faecalis* strains with PATRIC Proteome analysis services.



Table S6. Core
genome analysis of

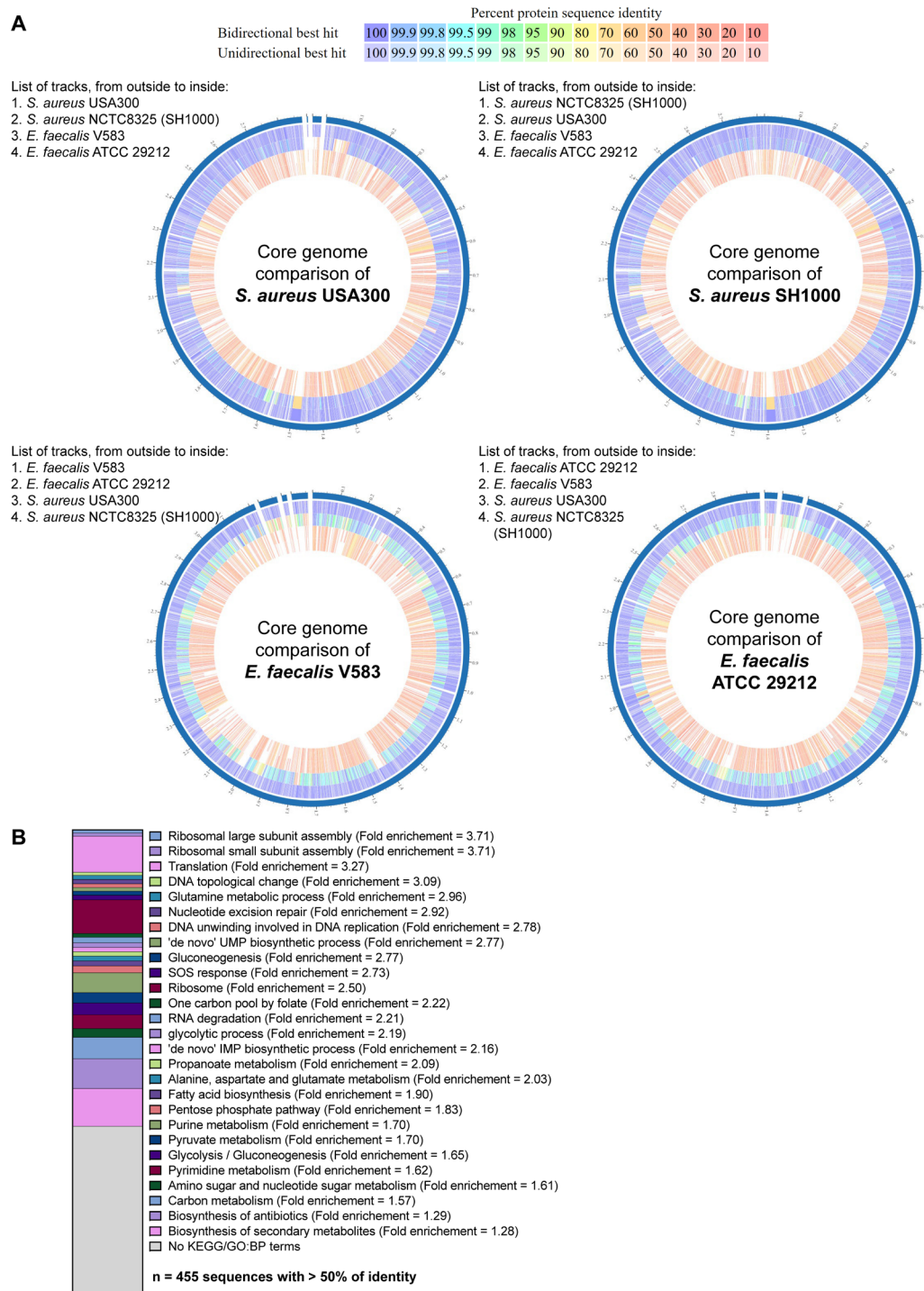


Figure S1 Core genome analysis between Gram-positive strains in a protein sequence-based homology manner. (A) Circular representation of *S. aureus*

and *E. faecalis* strains genomic comparison. Each ring represents the chromosome of a strain, where the outer ring is the reference genome and the three inner rings are the chromosomes of comparison, as indicated on the upper-left corner of each plot. Each line represents a CDS and its % of identity with the reference genome is represented by the blue (high) to the red (low) colour scale. Plots were generated using CIRCOS circular genome data visualization with PATRIC's proteome comparison service. (B) Cellular functions from the genes sharing at least 50% of identity ($n = 455$) in their protein sequence between the 4 strains of the transcriptomic study, obtained with PATRIC's proteome comparison service. Each row from the graph represents the proportion of genes attributed to a function relative to the total number of genes. The fold enrichment of each term is indicated next to its name. Functional annotation was performed with DAVID Bioinformatic software using GO:BP and KEGG pathways as annotation sources.

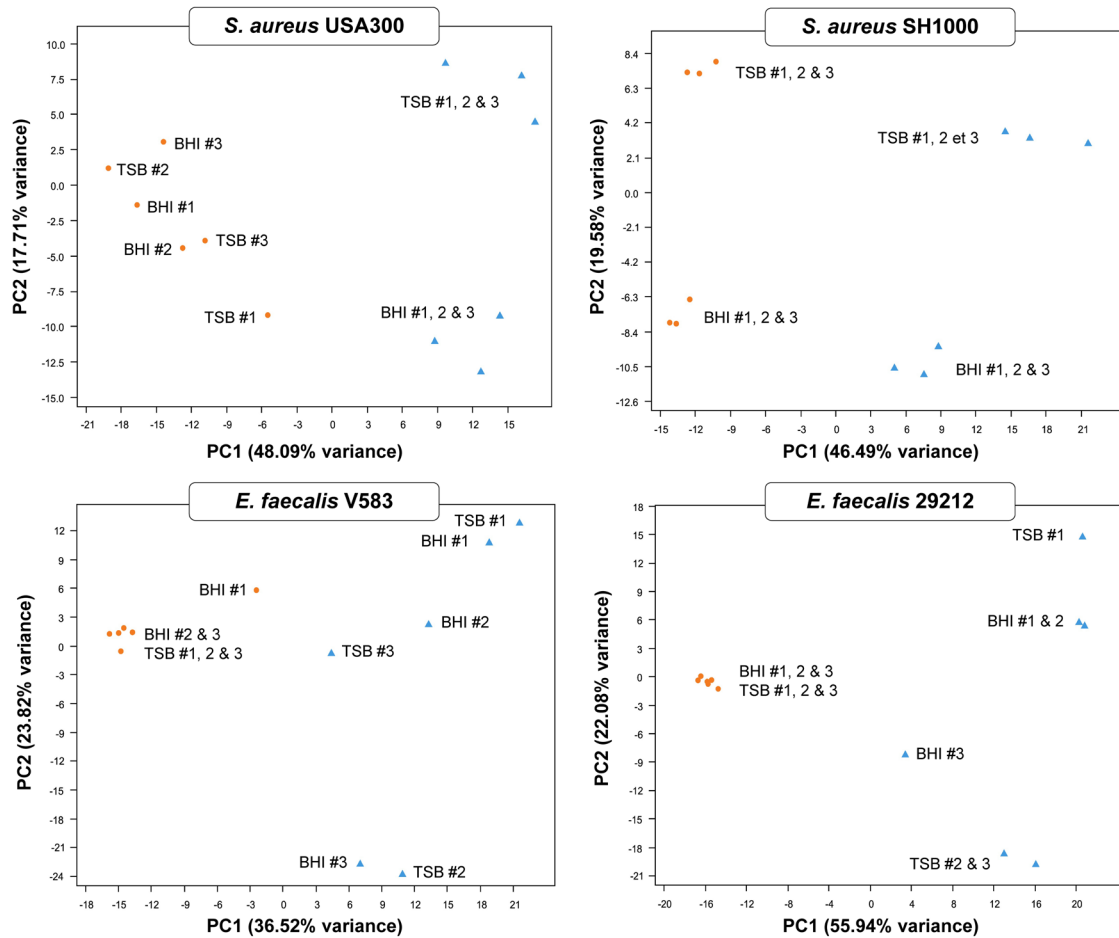


Figure S2 Principal component analysis (PCA) of the variance between the biological replicates from the transcriptomic analysis. The blue triangles represent planktonic cultures while the orange circles represent biofilm cultures of *S. aureus* or *E. faecalis*. The medium, either BHIg(s) and the TSBg(s), medium and its replicate's number are indicated next to their geometrical icon.

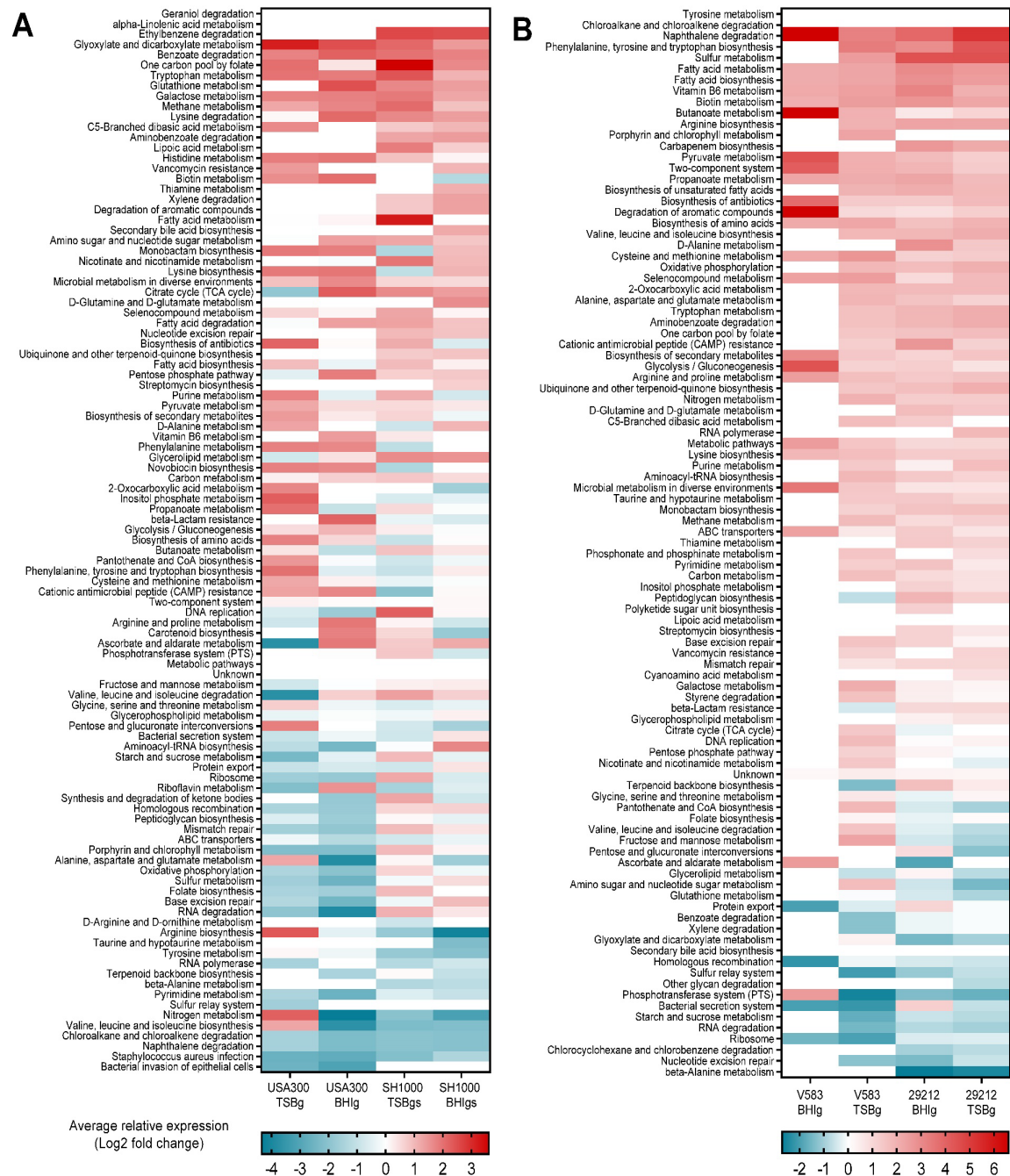


Figure S3 Relative expression of KEGG terms during biofilm formation. Each row of both heatmaps represents a single functional annotation term from DAVID Bioinformatic software using KEGG pathways annotation source. The term's relative expression is the average of the log2 fold change of every associated gene

with an adjusted P -value ≤ 0.05 from the transcriptomic analysis. The red (upregulated) and blue (downregulated) colour scale indicates relative expression level in average log2 fold change. (A) Functional annotation terms' (total = 103) relative expression in *S. aureus* USA300 and SH1000, in BHIg(s) or TSBg(s) medium. (B) Functional annotation terms' (total = 97) relative expression in *E. faecalis* V583 and 29212, in BHIg or TSBg medium.

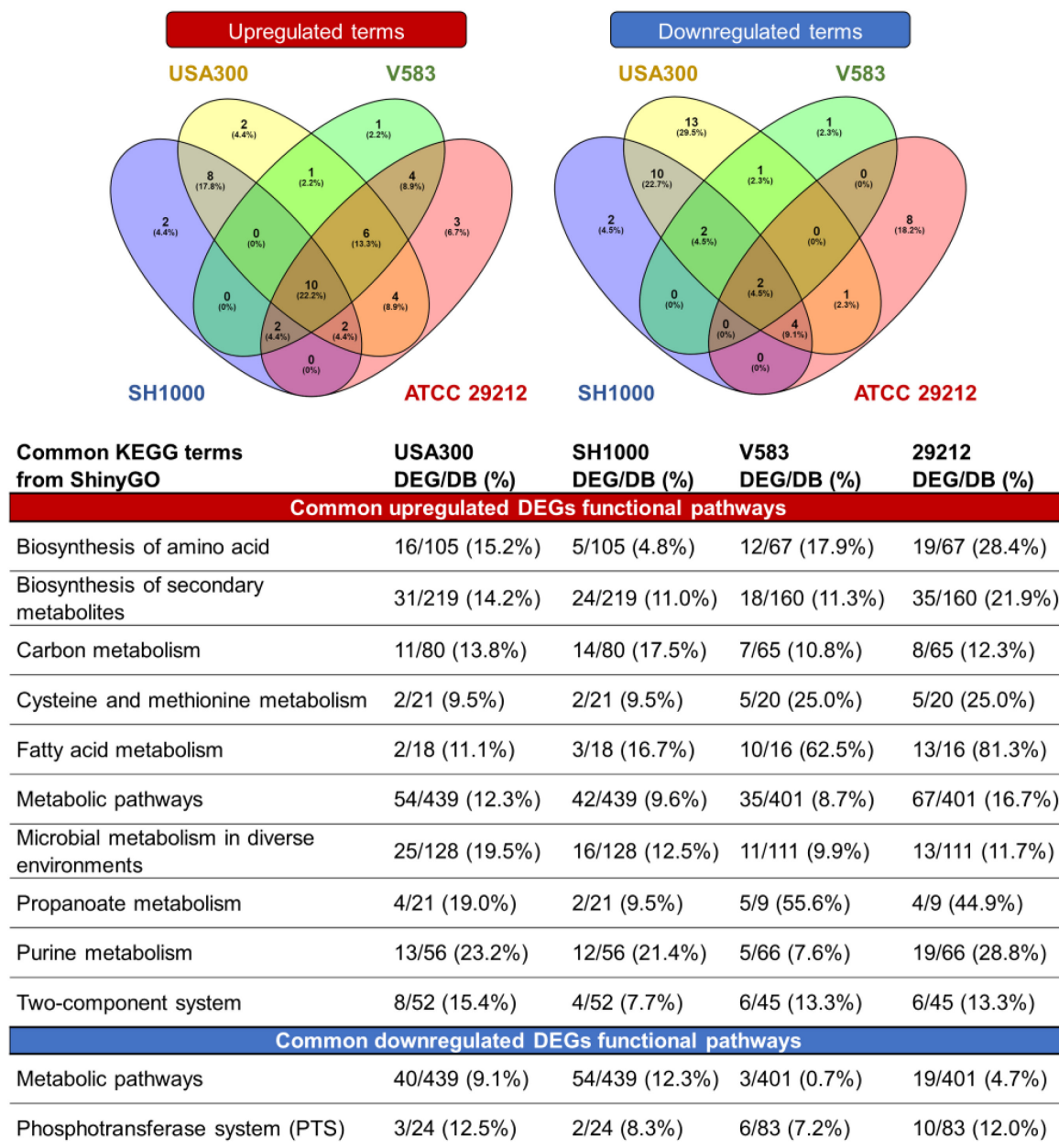


Figure S4 Common cellular adaptation between *S. aureus* and *E. faecalis* strains according to ShinyGO's database. (A) Venn diagram representation of the unique and common functional terms of the upregulated DEGs (P -value ≤ 0.05 , \log_2 fold change ≥ 2.0) and downregulated DEGs (P -value ≤ 0.05 , \log_2 fold change ≤ -2.0) between *S. aureus* USA300 (yellow), *S. aureus* SH1000 (blue), *E. faecalis*

V583 (green) and *E. faecalis* 29212 (red). (B) Table of the common cellular pathways between the four strains of this study, either upregulated or downregulated. GSEA was performed with ShinyGO using KEGG pathways and GO:BP annotation source. DEG/DB (%) is the number of DEGs submitted to ShinyGO reported on the number of genes existing in the database for the corresponding functional term (DB).

CHAPITRE 3

DISCUSSION ET CONCLUSION

3.1. Identification des adaptations cellulaires lors de la formation du biofilm chez *S. aureus* et *E. faecalis*.

À l'aide d'une étude du transcriptome de différentes souches de *S. aureus* et de *E. faecalis* durant la fin de la phase exponentielle de la formation de leur biofilm, nous avons identifié un remodelage de plusieurs voies métaboliques, à l'instar de celles qui avaient été retrouvées à travers différentes études de *S. aureus* et *E. faecalis*, comme discuté à la section 1.5.4, ou encore chez *B. subtilis* et *B. cereus* (Caro-Astorga et al., 2020; Pisithkul et al., 2019). La plupart des gènes différentiellement exprimés (DEGs) que nous avons retrouvés lors de la formation du biofilm de *S. aureus* furent attribués, à l'aide d'un GSEA, à différentes fonctions biologiques, telles que le cycle de Krebs, le métabolisme de plusieurs acides aminés, le métabolisme des nucléotides, le métabolisme des acides gras ou le métabolisme secondaire (figure 2.3 et figure S3). Enfin, parmi les différentes fonctions biologiques régulées positivement en biofilm, seules trois étaient régulées de façon commune entre les différentes souches de notre étude : la biosynthèse de métabolites secondaires, la biosynthèse d'antibiotiques et la biosynthèse des purines. Aucune fonction commune régulée négativement en biofilm n'a été identifiée (figure 2.4).

3.2. Impact du milieu de culture sur le patron d'expression des gènes lors de la formation du biofilm.

Nous voulions ensuite nous assurer que notre étude du transcriptome n'était pas influencée par notre choix de milieu de culture. L'utilisation de différents milieux avait déjà été rapportée pour influencer la composition et les propriétés

phénotypiques du biofilm de *B. subtilis* (Dogsa et al., 2013). Pour induire le biofilm de *S. aureus* ou de *E. faecalis*, les milieux de croissance *Tryptic Soy Broth* (TSB) et *Brain Heart Infusion* (BHI) supplémentés de glucose et/ou de chlorure de sodium (TSBg(s) et BHlg(s)) sont couramment utilisés. Cependant, chez *S. aureus*, il a été suggéré que le TSB favoriserait la production du PIA, tandis que le BHI stimulerait la formation d'une matrice de biofilm principalement protéique (Sadovskaya et al., 2005).

En comparant le profil transcriptomique des souches dans le TSBg(s) et le BHlg(s), toutes conditions de croissance confondues, nous avons retrouvé plusieurs DEGs dans l'un ou l'autre de ces milieux associés à des voies du métabolisme primaire et secondaire (Table S5). Peu de ces gènes se retrouvaient également dans l'analyse d'expression différentielle entre les cellules planctoniques et les cellules en biofilm chez *E. faecalis*. Par contre, une proportion d'environ 5% des DEGs retrouvés lors de la formation du biofilm chez *S. aureus* SH1000 pourraient être attribués à l'influence du milieu (figure 2.2). Nous ne pouvons donc pas ignorer l'influence que pourrait avoir le milieu inducteur de biofilm sur l'expression des gènes lors de la croissance bactérienne planctonique ou en biofilm, particulièrement chez *S. aureus*. Le milieu de culture devra donc être choisi avec précaution lors d'une expérience et ses effets devront être pris en compte dans des analyses subséquentes.

3.3. Importance de la voie de biosynthèse *de novo* de l'IMP lors de la formation du biofilm chez les bactéries à Gram positif.

À la suite de l'identification des voies cellulaires régulées de façon commune en biofilm, nous avons ciblé la biosynthèse des purines comme fonction biologique pouvant causer un impact significatif sur la production du biofilm chez les Gram positifs. Plusieurs études ont rapporté avoir observé une surexpression de certains gènes liés à la biosynthèse des purines lors de la formation du biofilm de certaines

bactéries à Gram positif (Ge et al., 2008; Philips et al., 2017; Pisithkul et al., 2019; Yan et al., 2017) et même de certaines bactéries à Gram négatif (Kim et al., 2014; Shaffer et al., 2017; Yoshioka and Newell, 2016). À l'instar de ces études, nous avons également retrouvé une forte régulation de la voie *de novo* de biosynthèse de l'IMP chez toutes les souches de l'étude. Étonnamment, les gènes de biosynthèse des purines en aval de la biosynthèse de l'IMP (*purA*, *purB*, *guaA* et *guaB*) et les gènes impliqués dans la voie de sauvetage des purines sont régulés de façon beaucoup plus faible et hétérogène entre les quatre souches de l'étude (figure 2.5). L'interruption de gènes individuels de la biosynthèse des purines impacte significativement la formation du biofilm chez *S. aureus* USA300 (figure 2.6A), mais la vaste majorité de ces délétions n'ont pas d'effet sur la croissance planctonique (figure 2.6B).

Le métabolisme des purines n'est pas la voie métabolique la plus fortement modulée chez *S. aureus* ou *E. faecalis*, ce qui expliquerait pourquoi elle n'a pas été étudiée plus en détail auparavant. Cependant, selon nos résultats, en accord avec le résultat d'autres études, il semblerait que ce soit la voie métabolique la plus constamment régulée lors de la formation du biofilm chez les Gram positifs. Malgré plusieurs observations sur l'implication et l'importance des purines lors de la formation du biofilm, leur rôle biologique dans ce processus demeure encore inconnu.

3.4. Perspectives et conclusion.

Il serait intéressant de caractériser le rôle exact que joue l'IMP ou les purines sur la formation du biofilm. Il faudrait d'abord continuer les essais phénotypiques de formation de biofilm avec d'autres mutants de la *Nebraska Transposon Mutant Library* (NTML) touchant de près ou de loin la voie des purines, afin de mieux discerner les gènes et les voies d'entrées essentielles à la formation du biofilm.

Plusieurs autres mutants impliqués de près ou de loin dans le métabolisme des purines sont accessibles avec la NTML, tel que *purNMQS* de la voie *de novo*, *deoD1* et *deoD2* de la voie de sauvetage ou *fhs* de la voie du folate.

Plusieurs hypothèses pourraient expliquer le rôle des purines sur le biofilm. Premièrement, les purines sont requises pour produire l'ADNe, un important constituant de la matrice extracellulaire de *S. aureus* (Dengler et al., 2015), *E. faecalis* (Thomas et al., 2008) et d'autres bactéries à Gram positif (Vilain et al., 2009). Cependant, une étude de Yan et ses collaborateurs (2017) a déjà démontré que la délétion des gènes *purD* ou *purH* n'affectait pas de façon significative la quantité d'ADNe dans la matrice extracellulaire. Deuxièmement, les purines sont requises pour produire certains métabolites, tel que la di-guanosine monophosphate cyclique (cyclic-di-GMP) ou la di-adénosine monophosphate cyclique (cyclic-di-AMP), deux molécules qui pourraient être impliquées dans la formation du biofilm chez plusieurs bactéries à Gram positif (Fahmi et al., 2019). Enfin, la GMP est précurseur à la production de guanosine pentophosphate (ppGpp), qui pourrait également jouer un rôle dans la formation du biofilm d'*E. faecalis* (Chávez de Paz et al., 2012).

Dans cette optique, limiter les nucléotides ou les molécules précurseurs de la voie de biosynthèse *de novo* des purines dans un milieu inducteur de biofilm pourrait aider à mieux comprendre l'implication des différentes voies de synthèse des purines dans la composition du biofilm. De plus, il pourrait être pertinent de supprimer les gènes de l'opéron *pur* chez *B. subtilis*, un organisme modèle pour l'étude des biofilms qui est plus facile à manipuler génétiquement que *S. aureus* et *E. faecalis*. Il serait alors possible de quantifier les composantes majeures du biofilm (les sucres, les protéines ou les acides nucléiques), ainsi que leur niveau d'expression, pour vérifier sur quelle(s) composante(s) interagissent les purines.

Dans un autre ordre d'idée, il serait intéressant de tester l'effet de drogues pré-existantes, seules ou combinées, ciblant la voie des purines sur la production de biofilm. Cette expérience permettra d'abord de confirmer l'importance des purines pour la formation du biofilm chez les autres souches de l'étude, qui ne possèdent pas de banque de mutant accessible ni d'outil de transformation efficace. Puis, il serait possible, en appliquant ce même modèle, de tester l'impact des purines sur d'autres souches d'intérêt clinique, telles que les ESKAPE. Enfin, il serait possible de tester la synergie entre les drogues anti-biofilm ciblant les purines et des antibiotiques.

Ces expériences proposées permettront de valider l'importance des purines dans la formation du biofilm des bactéries à Gram positif, afin de proposer une nouvelle alternative anti-biofilm qui ciblerait un plus large spectre de bactéries et permettrait de créer une nouvelle combinaison thérapeutique pour combattre les infections causées par les biofilms.

BIBLIOGRAPHIE

Ali, L., Goraya, M.U., Arafat, Y., Ajmal, M., Chen, J.L., and Yu, D. (2017). Molecular mechanism of quorum-sensing in *Enterococcus faecalis*: Its role in virulence and therapeutic approaches. *Int. J. Mol. Sci.* **18**.

Allon, M. (2007). Current management of vascular access. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **2**, 786–800.

Amato, S.M., Fazen, C.H., Henry, T.C., Mok, W.W.K., Orman, M.A., Sandvik, E.L., Volzing, K.G., and Brynildsen, M.P. (2014). The role of metabolism in bacterial persistence. *Front. Microbiol.* **5**.

Ammons, M.C.B., Tripet, B.P., Carlson, R.P., Kirker, K.R., Gross, M.A., Stanisich, J.J., and Copié, V. (2014). Quantitative NMR metabolite profiling of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* discriminates between biofilm and planktonic phenotypes. *J. Proteome Res.* **13**, 2973–2985.

Arciola, C.R., Campoccia, D., and Montanaro, L. (2018). Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion. *Nat. Rev. Microbiol.* **16**, 397–409.

Beenken, K.E., Dunman, P.M., McAleese, F., Macapagal, D., Murphy, E., Projan, S.J., Blevins, J.S., and Smeltzer, M.S. (2004). Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J. Bacteriol.* **186**, 4665–4684.

Beloin, C., Renard, S., Ghigo, J.M., and Lebeaux, D. (2014). Novel approaches to combat bacterial biofilms. *Curr. Opin. Pharmacol.* **18**, 61–68.

Biswas, R., Voggu, L., Simon, U.K., Hentschel, P., Thumm, G., and Gäßitz, F. (2006). Activity of the major staphylococcal autolysin Atl. *FEMS Microbiol. Lett.* **259**, 260–268.

Bose, J.L., Fey, P.D., and Bayles, K.W. (2013). Genetic tools to enhance the study of gene function and regulation in *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 2218–2224.

Caro-Astorga, J., Frenzel, E., Perkins, J.R., Álvarez-Mena, A., de Vicente, A., Ranea, J.A.G., Kuipers, O.P., and Romero, D. (2020). Biofilm formation displays intrinsic offensive and defensive features of *Bacillus cereus*. *Npj Biofilms Microbiomes* **6**.

Ch'ng, J.H., Chong, K.K.L., Lam, L.N., Wong, J.J., and Kline, K.A. (2019). Biofilm-associated infection by enterococci. *Nat. Rev. Microbiol.* **17**, 82–94.

Chávez de Paz, L.E., Lemos, J.A., Wickström, C., and Sedgley, C.M. (2012). Role of (p)ppGpp in biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Appl. Environ. Microbiol.*

78, 1627–1630.

Chen, Y., Yan, F., Chai, Y., Liu, H., Kolter, R., Losick, R., and Guo, J. (2013). Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation. *Environ. Microbiol.* **15**, 848–864.

Corrigan, R.M., Bellows, L.E., Wood, A., and Gründling, A. (2016). PpGpp negatively impacts ribosome assembly affecting growth and antimicrobial tolerance in Gram positive bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, E1710–E1719.

Costerton, J.W., Cheng, K.J., Geesey, G.G., Ladd, T.I., Nickel, J.C., Dasgupta, M., and Marrie, T.J. (1987). Bacterial Biofilms in Nature and Disease. *Annu. Rev. Microbiol.* **41**, 435–464.

Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, Í., and Penadés, J.R. (2001). Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J. Bacteriol.* **183**, 2888–2896.

Cue, D., Lei, M.G., and Lee, C.Y. (2012). Genetic regulation of the intercellular adhesion locus in staphylococci. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2**, 38.

D’Agata, E.M.C., Webb, G.F., Horn, M.A., Moellering, Jr., R.C., and Ruan, S. (2009). Modeling the Invasion of Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* into Hospitals. *Clin. Infect. Dis.* **48**, 274–284.

Dale, J.L., Nilson, J.L., Barnes, A.M.T., and Dunny, G.M. (2017). Restructuring of *Enterococcus faecalis* biofilm architecture in response to antibiotic-induced stress. *Npj Biofilms Microbiomes* **3**, 15.

Davies, D. (2003). Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2**, 114–122.

Dengler, V., Foulston, L., DeFrancesco, A.S., and Losick, R. (2015). An electrostatic net model for the role of extracellular DNA in biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **197**, 3779–3787.

Dieltjens, L., Appermans, K., Lissens, M., Lories, B., Kim, W., Van der Eycken, E. V., Foster, K.R., and Steenackers, H.P. (2020). Inhibiting bacterial cooperation is an evolutionarily robust anti-biofilm strategy. *Nat. Commun.* **11**, 107.

Dogsa, I., Brloznic, M., Stopar, D., and Mandic-Mulec, I. (2013). Exopolymer Diversity and the Role of Levan in *Bacillus subtilis* Biofilms. *PLoS One* **8**, e62044.

Donlan, R.M. (2002). Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* **8**, 881–890.

Doulgeraki, A.I., Di Ciccio, P., Ianieri, A., and Nychas, G.-J.E. (2017). Methicillin-

resistant food-related *Staphylococcus aureus*: a review of current knowledge and biofilm formation for future studies and applications. *Res. Microbiol.* 168, 1–15.

Ebbole, D.J., and Zalkin, H. (1989). *Bacillus subtilis* pur operon expression and regulation. *J. Bacteriol.* 171, 2136–2141.

Edmond, M.B., Ober, J.F., Dawson, J.D., Weinbaum, D.L., and Wenzel, R.P. (1996). Vancomycin-Resistant Enterococcal Bacteremia: Natural History and Attributable Mortality. *Clin. Infect. Dis.* 23, 1234–1239.

Van Epps, J.S., and Younger, J.G. (2016). Implantable device-related infection. *Shock* 46, 597–608.

Fahmi, T., Faozia, S., Port, G.C., and Cho, K.H. (2019). The second messenger C-di-AMP regulates diverse cellular pathways involved in stress response, biofilm formation, cell wall homeostasis, speB expression, and virulence in *Streptococcus pyogenes*. *Infect. Immun.* 87, 1–19.

Fair, R.J., and Tor, Y. (2014). Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspect. Medicin. Chem.* 25–64.

Fisher, K., and Phillips, C. (2009). The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology* 155, 1749–1757.

Fitzpatrick, F., Humphreys, H., and O’Gara, J.P. (2005). Evidence for icaADBC-independent biofilm development mechanism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* 43, 1973–1976.

Flahaut, S., Hartke, A., Giard, J., Benachour, A., Boutibonnes, P., and Auffray, Y. (1996). Relationship between stress response towards bile salts, acid and heat treatment in *Enterococcus faecalis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 138, 49–54.

Fleming, D., and Rumbaugh, K. (2018). The Consequences of Biofilm Dispersal on the Host. *Sci. Rep.* 8.

Flemming, H.C., and Wuertz, S. (2019). Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* 17, 247–260.

Flemming, H.C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S.A., and Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 563–575.

Floyd, K.A., Eberly, A.R., and Hadjifrangiskou, M. (2017). Adhesion of bacteria to surfaces and biofilm formation on medical devices. In *Biofilms and Implantable Medical Devices: Infection and Control*, (Elsevier Inc.), pp. 47–95.

Foulquié Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., and De Vuyst, L. (2006). The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food Microbiol.* 106, 1–24.

Frank, K.L., Guiton, P.S., Barnes, A.M.T., Manias, D.A., Chuang-Smith, O.N., Kohler, P.L., Spaulding, A.R., Hultgren, S.J., Schlievert, P.M., and Dunny, G.M. (2013). AhrC and Eep are biofilm infection-associated virulence factors in *Enterococcus faecalis*. *Infect. Immun.* **81**, 1696–1708.

Frank, K.L., Vergidis, P., Brinkman, C.L., Greenwood Quaintance, K.E., Barnes, A.M.T., Mandrekar, J.N., Schlievert, P.M., Dunny, G.M., and Patel, R. (2015). Evaluation of the *Enterococcus faecalis* biofilm-associated virulence factors AhrC and Eep in rat foreign body osteomyelitis and in vitro biofilm-associated antimicrobial resistance. *PLoS One* **10**, e0130187.

Fuchs, S., Mehlan, H., Bernhardt, J., Hennig, A., Michalik, S., Surmann, K., Pané-Farré, J., Giese, A., Weiss, S., Backert, L., et al. (2018). AureoWiki-The repository of the *Staphylococcus aureus* research and annotation community. *Int. J. Med. Microbiol.* **308**, 558–568.

Galié, S., García-Gutiérrez, C., Miguélez, E.M., Villar, C.J., and Lombó, F. (2018). Biofilms in the food industry: Health aspects and control methods. *Front. Microbiol.* **9**.

Garrett, T.R., Bhakoo, M., and Zhang, Z. (2008). Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Prog. Nat. Sci.* **18**, 1049–1056.

Ge, S.X., Jung, D., Jung, D., and Yao, R. (2020). ShinyGO: A graphical gene-set enrichment tool for animals and plants. *Bioinformatics* **36**, 2628–2629.

Ge, X., Kitten, T., Chen, Z., Lee, S.P., Munro, C.L., and Xu, P. (2008). Identification of *Streptococcus sanguinis* genes required for biofilm formation and examination of their role in endocarditis virulence. *Infect. Immun.* **76**, 2551–2559.

Gil, R., Silva, F.J., Pereto, J., and Moya, A. (2004). Determination of the Core of a Minimal Bacterial Gene Set. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 518–537.

Gross, M., Cramton, S.E., Götz, F., and Peschel, A. (2001). Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. *Infect. Immun.* **69**, 3423–3426.

Hancock, L.E., and Perego, M. (2004). The *Enterococcus faecalis* fsr two-component system controls biofilm development through production of gelatinase. *J. Bacteriol.* **186**, 5629–5639.

Henry-Stanley, M.J., Shepherd, M.M., Wells, C.L., and Hess, D.J. (2011). Role of *Staphylococcus aureus* protein A in adherence to silastic catheters. *J. Surg. Res.* **167**, 9–13.

Herbert, S., Ziebandt, A.K., Ohlsen, K., Schäfer, T., Hecker, M., Albrecht, D., Novick, R., and Götz, F. (2010). Repair of global regulators in *Staphylococcus aureus* 8325 and comparative analysis with other clinical isolates. *Infect. Immun.* **78**, 2877–2889.

- Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., and Ciofu, O. (2010a). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents* 35, 322–332.
- Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., and Ciofu, O. (2010b). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents* 35, 322–332.
- Høiby, N., Ciofu, O., Johansen, H.K., Song, Z.J., Moser, C., Jensen, P.Ø., Molin, S., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T., and Bjarnsholt, T. (2011). The clinical impact of bacterial biofilms. In *International Journal of Oral Science*, pp. 55–65.
- Hook, A.L., Chang, C.Y., Yang, J., Luckett, J., Cockayne, A., Atkinson, S., Mei, Y., Bayston, R., Irvine, D.J., Langer, R., et al. (2012). Combinatorial discovery of polymers resistant to bacterial attachment. *Nat. Biotechnol.* 30, 868–875.
- Huang, D.W., Sherman, B.T., and Lempicki, R.A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* 4, 44–57.
- Hufnagel, M., Koch, S., Creti, R., Baldassarri, L., and Huebner, J. (2004). A Putative Sugar-Binding Transcriptional Regulator in a Novel Gene Locus in *Enterococcus faecalis* Contributes to Production of Biofilm and Prolonged Bacteremia in Mice . *J. Infect. Dis.* 189, 420–430.
- Huycke, M.M., Sahm, D.F., and Gilmore, M.S. (1998). Multiple-drug resistant enterococci: The nature of the problem and an agenda for the future. *Emerg. Infect. Dis.* 4, 239–249.
- Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M.A., Hussain, T., Ali, M., Rafiq, M., and Kamil, M.A. (2018). Bacterial biofilm and associated infections. *J. Chinese Med. Assoc.* 81.
- Jefferson, K.K., Cramton, S.E., Götz, F., and Pier, G.B. (2003). Identification of a 5-nucleotide sequence that controls expression of the *ica* locus in *Staphylococcus aureus* and characterization of the DNA-binding properties of IcaR. *Mol. Microbiol.* 48, 889–899.
- Jolivet-Gougeon, A., and Bonnaure-Mallet, M. (2014). Biofilms as a mechanism of bacterial resistance. *Drug Discov. Today Technol.* 11, 49–56.
- Justo, J.A., and Bookstaver, P.B. (2014). Antibiotic lock therapy: Review of technique and logistical challenges. *Infect. Drug Resist.* 7, 343–363.
- Kaplan, J.B. (2010). Biofilm Dispersal: Mechanisms, Clinical Implications, and Potential Therapeutic Uses. *J. Dent. Res.* 89, 205–218.
- Karp, P.D., Paley, S.M., Midford, P.E., Krummenacker, M., Billington, R., Kothari, A., Ong, W.K., Subhraveti, P., Keseler, I.M., and Caspi, R. (2015). Pathway Tools version 23.0: Integrated Software for Pathway/Genome Informatics and Systems Biology. *Brief. Bioinform.* 11, 40–79.

- Khatoon, Z., McTiernan, C.D., Suuronen, E.J., Mah, T.F., and Alarcon, E.I. (2018). Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. *Heliyon* 4.
- Kilstrup, M., Hammer, K., Ruhdal Jensen, P., and Martinussen, J. (2005). Nucleotide metabolism and its control in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 555–590.
- Kim, J.K., Kwon, J.Y., Kim, S.K., Han, S.H., Won, Y.J., Lee, J.H., Kim, C.H., Fukatsu, T., and Lee, B.L. (2014). Purine biosynthesis, biofilm formation, and persistence of an insect-microbe gut symbiosis. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 4374–4382.
- Kluytmans, J., Van Belkum, A., and Verbrugh, H. (1997). Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: Epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin. Microbiol. Rev.* 10, 505–520.
- Langmead, B., and Salzberg, S.L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* 9, 357–359.
- Lebeaux, D., Ghigo, J.-M., and Beloin, C. (2014). Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 78, 510–543.
- Lécuyer, F., Bourassa, J.-S., Gélinas, M., Charron-Lamoureux, V., Burrus, V., and Beauregard, P.B. (2018). Biofilm Formation Drives Transfer of the Conjugative Element ICEBs1 in *Bacillus subtilis*. *MSphere* 3, e00473-18.
- Lewis, K. (2001). Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 999–1007.
- Liu, J., Hou, Y., Peters, B.M., Su, J., Li, L., Li, B., Chen, D., Li, Y., Xu, Z., and Shirtliff, M.E. (2018). Transcriptomics study on *Staphylococcus aureus* biofilm under low concentration of ampicillin. *Front. Microbiol.* 9, 2413.
- Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15, 550.
- Mack, D., Fischer, W., Krokotsch, A., Leopold, K., Hartmann, R., Egge, H., and Laufs, R. (1996). The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear β -1,6-linked glucosaminoglycan: Purification and structural analysis. *J. Bacteriol.* 178, 175–183.
- Mack, D., Becker, P., Chatterjee, I., Dobinsky, S., Knobloch, J.K.M., Peters, G., Rohde, H., and Herrmann, M. (2004). Mechanisms of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*: Functional molecules, regulatory circuits, and adaptive responses. *Int. J. Med. Microbiol.* 294, 203–212.
- Madsen, J.S., Burmølle, M., Hansen, L.H., and Sørensen, S.J. (2012). The

interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **65**, 183–195.

Malheiro, J., and Simões, M. (2016). Antimicrobial resistance of biofilms in medical devices. In *Biofilms and Implantable Medical Devices: Infection and Control*, (Elsevier Inc.), pp. 98–113.

McCarthy, H., Rudkin, J.K., Black, N.S., Gallagher, L., O'Neill, E., and O'Gara, J.P. (2015). Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **5**, 1.

McDougal, L.K., Steward, C.D., Killgore, G.E., Chaitram, J.M., McAllister, S.K., and Tenover, F.C. (2003). Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 5113–5120.

Minogue, T.D., Daligault, H.E., Davenport, K.W., Broomall, S.M., Bruce, D.C., Chain, P.S., Coyne, S.R., Chertkov, O., Freitas, T., Gibbons, H.S., et al. (2014). Complete Genome Assembly of *Enterococcus faecalis* 29212, a Laboratory Reference Strain. *Genome Announc.* **2**.

Mlynek, K.D., Bullock, L.L., Stone, C.J., Curran, L.J., Marat, R., Bayles, K.W., and Brinsmade, S.R. (2020). Genetic and biochemical analysis of CodY-mediated cell aggregation in *Staphylococcus aureus* reveals an interaction between eDNA and polysaccharide in the extracellular matrix. *J. Bacteriol.*

Mohamed, J.A., and Huang, D.B. (2007). Biofilm formation by enterococci. *J. Med. Microbiol.* **56**, 1581–1588.

Moormeier, D.E., and Bayles, K.W. (2017). *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. *Mol. Microbiol.* **104**, 365–376.

Moormeier, D.E., Bose, J.L., Horswill, A.R., and Bayles, K.W. (2014). Temporal and stochastic control of *Staphylococcus aureus* biofilm development. *MBio* **5**.

Mulani, M.S., Kamble, E.E., Kumkar, S.N., Tawre, M.S., and Pardesi, K.R. (2019). Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: A review. *Front. Microbiol.* **10**.

Nimmo, G.R. (2012). USA300 abroad: global spread of a virulent strain of community- associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* **18**, 725–734.

O'Gara, J.P. (2007). *ica* and beyond: Biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **270**, 179–188.

O'Neill, A.J. (2010). *Staphylococcus aureus* SH1000 and 8325-4: comparative genome sequences of key laboratory strains in staphylococcal research. *Lett.*

Appl. Microbiol. 51, 358–361.

O'Neill, E., Pozzi, C., Houston, P., Smyth, D., Humphreys, H., Robinson, D.A., and O'Gara, J.P. (2007). Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from device-related infections. J. Clin. Microbiol. 45, 1379–1388.

O'Toole, G.A. (2010). Microtiter dish Biofilm formation assay. J. Vis. Exp.

Olivieros, J.C. (2007). VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams.

Otto, M. (2013). Staphylococcal Infections: Mechanisms of Biofilm Maturation and Detachment as Critical Determinants of Pathogenicity. Annu. Rev. Med. 64, 175–188.

Patti, J.M., Allen, B.L., McGavin, M.J., and Hook, M. (1994). MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. Annu. Rev. Microbiol. 48, 585–617.

Paulsen, I.T. (2003). Role of Mobile DNA in the Evolution of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis*. Science (80-.). 299, 2071–2074.

Pedley, A.M., and Benkovic, S.J. (2017). A New View into the Regulation of Purine Metabolism: The Purinosome. Trends Biochem. Sci. 42, 141–154.

Philips, J., Rabaey, K., Lovley, D.R., and Vargas, M. (2017). Biofilm formation by *Clostridium ljungdahlii* is induced by sodium chloride stress: Experimental evaluation and transcriptome analysis. PLoS One 12.

Pillai, S.K., Sakoulas, G., Eliopoulos, G.M., Moellering, Jr., R.C., Murray, B.E., and Inouye, R.T. (2004). Effects of Glucose on *fsr*- Mediated Biofilm Formation in *Enterococcus faecalis*. J. Infect. Dis. 190, 967–970.

Pisithkul, T., Schroeder, J.W., Trujillo, E.A., Yeesin, P., Stevenson, D.M., Chaikumar, T., Coon, J.J., Wang, J.D., and Amador-Noguez, D. (2019). Metabolic Remodeling during Biofilm Development of *Bacillus subtilis*. MBio 10, e00623-19.

Public Health Agency of Canada (2014). Central Venous Catheter-Associated Blood Stream Infections in Intensive Care Units in Canadian Acute-Care Hospitals - Surveillance Report (Centre for Communicable Diseases and Infection Control, Public Health Agency of Canada).

Resch, A., Rosenstein, R., Nerz, C., and Götz, F. (2005). Differential gene expression profiling of *Staphylococcus aureus* cultivated under biofilm and planktonic conditions. Appl. Environ. Microbiol. 71, 2663–2676.

Resch, A., Leicht, S., Saric, M., Pásztor, L., Jakob, A., Götz, F., and Nordheim, A. (2006). Comparative proteome analysis of *Staphylococcus aureus* biofilm and

planktonic cells and correlation with transcriptome profiling. *Proteomics* 6, 1867–1877.

Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Flahaut, S., Kogan, G., and Jabbouri, S. (2005). Extracellular carbohydrate-containing polymers of a model biofilm-producing strain, *Staphylococcus epidermidis* RP62A. *Infect. Immun.* 73, 3007–3017.

Sahm, D.F., Kissinger, J., Gilmore, M.S., Murray, P.R., Mulder, R., Solliday, J., and Clarke, B. (1989). In vitro susceptibility studies of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33, 1588–1591.

Sahoo, D., Bhatt, M., Jena, S., Dash, D., and Chayani, N. (2015). Study of biofilm in bacteria from water pipelines. *J. Clin. Diagnostic Res.* 9, 9–11.

Seidl, K., Goerke, C., Wolz, C., Mack, D., Berger-Bächi, B., and Bischoff, M. (2008). *Staphylococcus aureus* CcpA affects biofilm formation. *Infect. Immun.* 76, 2044–2050.

Seneviratne, C.J., Suriyanarayanan, T., Swarup, S., Chia, K.H.B., Nagarajan, N., and Zhang, C. (2017). Transcriptomics Analysis Reveals Putative Genes Involved in Biofilm Formation and Biofilm-associated Drug Resistance of *Enterococcus faecalis*. *J. Endod.* 43, 949–955.

Shaffer, C.L., Zhang, E.W., Dudley, A.G., Dixon, B.R.E.A., Guckes, K.R., Breland, E.J., Floyd, K.A., Casella, D.P., Algood, H.M.S., Clayton, D.B., et al. (2017). Purine biosynthesis metabolically constrains intracellular survival of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 85.

Shi, T., Wang, Y., Wang, Z., Wang, G., Liu, D., Fu, J., Chen, T., and Zhao, X. (2014). Deregulation of purine pathway in *Bacillus subtilis* and its use in riboflavin biosynthesis. *Microb. Cell Fact.* 13, 101.

Solano, C., Echeverez, M., and Lasa, I. (2014). Biofilm dispersion and quorum sensing. *Curr. Opin. Microbiol.* 18, 96–104.

Stipetic, L.H., Dalby, M.J., Davies, R.L., Morton, F.R., Ramage, G., and Burgess, K.E. V. (2016). A novel metabolomic approach used for the comparison of *Staphylococcus aureus* planktonic cells and biofilm samples. *Metabolomics* 12, 75.

Sugimoto, S., Sato, F., Miyakawa, R., Chiba, A., Onodera, S., Hori, S., and Mizunoe, Y. (2018). Broad impact of extracellular DNA on biofilm formation by clinically isolated Methicillin-resistant and -sensitive strains of *Staphylococcus aureus*. *Sci. Rep.* 8.

Suryaletha, K., Narendrakumar, L., John, J., Radhakrishnan, M.P., George, S., and Thomas, S. (2019). Decoding the proteomic changes involved in the biofilm formation of *Enterococcus faecalis* SK460 to elucidate potential biofilm determinants. *BMC Microbiol.* 19, 146.

Swenson, J.M., Clark, N.C., Sahm, D.F., Ferraro, M.J., Doern, G., Hindler, J., Jorgensen, J.H., Pfaller, M.A., Reller, † L Barth, Weinstein, M.P., et al. (1995). Molecular Characterization and Multilaboratory Evaluation of *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 for Quality Control of Screening Tests for Vancomycin and High-Level Aminoglycoside Resistance in Enterococci.

Switzer, R.L., Bond, R.W., Ruppen, M.E., and Rosenzweig, S. (1985). Involvement of the Stringent Response in Regulation of Protein Degradation in *Bacillus subtilis*. In Current Topics in Cellular Regulation, pp. 373–386.

Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D.L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., et al. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect. Dis.* 18, 318–327.

Tendolkar, P.M., Baghdayan, A.S., Gilmore, M.S., and Shankar, N. (2004). Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect. Immun.* 72, 6032–6039.

Tendolkar, P.M., Baghdayan, A.S., and Shankar, N. (2006). Putative surface proteins encoded within a novel transferable locus confer a high-biofilm phenotype to *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* 188, 2063–2072.

Tenover, F.C., and Goering, R. V (2009). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300: Origin and epidemiology. *J. Antimicrob. Chemother.* 64, 441–446.

Thomas, V.C., Thurlow, L.R., Boyle, D., and Hancock, L.E. (2008). Regulation of autolysis-dependent extracellular DNA release by *Enterococcus faecalis* extracellular proteases influences biofilm development. *J. Bacteriol.* 190, 5690–5698.

Thurlow, L.R., Joshi, G.S., Clark, J.R., Spontak, J.S., Neely, C.J., Maile, R., and Richardson, A.R. (2013). Functional modularity of the arginine catabolic mobile element contributes to the success of USA300 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Cell Host Microbe* 13, 100–107.

Toledo-Arana, A., Valle, J., Solano, C., Arrizubieta, M.J., Cucarella, C., Lamata, M., Amorena, B., Leiva, J., Penadés, J.R., and Lasa, I. (2001). The Enterococcal Surface Protein, Esp, Is Involved in *Enterococcus faecalis* Biofilm Formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4538–4545.

Turnbough, C.L., and Switzer, R.L. (1975). Oxygen-dependent inactivation of glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase in stationary-phase cultures of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 121, 108–114.

Turner, N.A., Sharma-Kuinkel, B.K., Maskarinec, S.A., Eichenberger, E.M., Shah, P.P., Carugati, M., Holland, T.L., and Fowler, V.G. (2019). Methicillin-resistant

Staphylococcus aureus: an overview of basic and clinical research. Nat. Rev. Microbiol. 17, 203–218.

Ulrich, M., Bastian, M., Cramton, S.E., Ziegler, K., Pragman, A.A., Bragonzi, A., Memmi, G., Wolz, C., Schlievert, P.M., Cheung, A., et al. (2007). The staphylococcal respiratory response regulator SrrAB induces ica gene transcription and polysaccharide intercellular adhesin expression, protecting *Staphylococcus aureus* from neutrophil killing under anaerobic growth conditions. Mol. Microbiol. 65, 1276–1287.

Ventola, C.L. (2015). The antibiotic resistance crisis: causes and threats. P T J. 40, 277–283.

Vilain, S., Pretorius, J.M., Theron, J., and Brözel, V.S. (2009). DNA as an adhesin: *Bacillus cereus* requires extracellular DNA to form biofilms. Appl. Environ. Microbiol. 75, 2861–2868.

Wang, M., Wei, H., Zhao, Y., Shang, L., Di, L., Lyu, C., and Liu, J. (2019). Analysis of multidrug-resistant bacteria in 3223 patients with hospital-acquired infections (HAI) from a tertiary general hospital in China. Bosn. J. Basic Med. Sci. 19, 86–93.

Wang, X., He, X., Jiang, Z., Wang, J., Chen, X., Liu, D., Wang, F., Guo, Y., Zhao, J., Liu, F., et al. (2010). Proteomic analysis of the *Enterococcus faecalis* V583 strain and clinical isolate V309 under vancomycin treatment. J. Proteome Res. 9, 1772–1785.

Wattam, A.R., Davis, J.J., Assaf, R., Boisvert, S., Brettin, T., Bun, C., Conrad, N., Dietrich, E.M., Disz, T., Gabbard, J.L., et al. (2016). Improvements to PATRIC, the all-bacterial Bioinformatics Database and Analysis Resource Center. Nucleic Acids Res. 45, 535–542.

Wertheim, H.F.L., Melles, D.C., Vos, M.C., Van Leeuwen, W., Van Belkum, A., Verbrugh, H.A., and Nouwen, J.L. (2005). The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. Lancet Infect. Dis. 5, 751–762.

Willett, J.L.E., Ji, M.M., and Dunny, G.M. (2019). Exploiting biofilm phenotypes for functional characterization of hypothetical genes in *Enterococcus faecalis*. NPJ Biofilms Microbiomes 5, 23.

Wong, J.Y., Bernlohr, D.A., Turnbough, C.L., and Switzer, R.L. (1981). Purification and properties of glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase from *Bacillus subtilis*. Biochemistry 20, 5669–5674.

World Health Organisation (2017). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics (World Health Organization).

Yan, F., Yu, Y., Gozzi, K., Chen, Y., Guo, J.H., and Chai, Y. (2017). Genome-wide investigation of biofilm formation in *Bacillus cereus*. Appl. Environ. Microbiol. 83.

- Yin, W., Wang, Y., Liu, L., and He, J. (2019). Biofilms: The microbial “protective clothing” in extreme environments. *Int. J. Mol. Sci.* 20.
- Yoshioka, S., and Newell, P.D. (2016). Disruption of de novo purine biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 leads to reduced biofilm formation and a reduction in cell size of surface-attached but not planktonic cells. *PeerJ* 2016.
- You, Y., Xue, T., Cao, L., Zhao, L., Sun, H., and Sun, B. (2014). *Staphylococcus aureus* glucose-induced biofilm accessory proteins, GbaAB, influence biofilm formation in a PIA-dependent manner. *Int. J. Med. Microbiol.* 304, 603–612.
- Zhang, Y., Morar, M., and Ealick, S.E. (2008). Structural biology of the purine biosynthetic pathway. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 3699–3724.
- Zheng, J.X., Bai, B., Lin, Z.W., Pu, Z.Y., Yao, W.M., Chen, Z., Li, D.Y., Deng, X. Bin, Deng, Q.W., and Yu, Z.J. (2018). Characterization of biofilm formation by *Enterococcus faecalis* isolates derived from urinary tract infections in China. *J. Med. Microbiol.* 67, 60–67.
- Zhu, Y., Weiss, E.C., Otto, M., Fey, P.D., Smeltzer, M.S., and Somerville, G.A. (2007a). *Staphylococcus aureus* biofilm metabolism and the influence of arginine on polysaccharide intercellular adhesin synthesis, biofilm formation, and pathogenesis. *Infect. Immun.* 75, 4219–4226.
- Zhu, Y., Weiss, E.C., Otto, M., Fey, P.D., Smeltzer, M.S., and Somerville, G.A. (2007b). *Staphylococcus aureus* biofilm metabolism and the influence of arginine on polysaccharide intercellular adhesin synthesis, biofilm formation, and pathogenesis. *Infect. Immun.* 75, 4219–4226.
- Zhu, Y., Xiong, Y.Q., Sadykov, M.R., Fey, P.D., Lei, M.G., Lee, C.Y., Bayer, A.S., and Somerville, G.A. (2009). Tricarboxylic acid cycle-dependent attenuation of *Staphylococcus aureus* in vivo virulence by selective inhibition of amino acid transport. *Infect. Immun.* 77, 4256–4264.

